

**T-Zell-vermittelte Autoimmunität –
die Rolle von T-Zellen verschiedener Phänotypen
und deren Interaktion mit dem betroffenen Gewebe
unter besonderer Beachtung des
Zentralnervensystems**

**Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach**

Immunologie

**vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von

**Dr. rer. nat. Ulrike Gimsa
geboren am 3.9.1967 in Merseburg**

**Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek
Dekan: Prof. Dr. med. J.W. Dudenhausen**

**eingereicht im April 2003
Tag der mündlichen Prüfung: 26.2.2004**

**Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dietrich Kabelitz
2. Prof. Dr. med. Adriano Fontana**

Abstract

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit T-Helferzellen und ihren Interaktionen mit Gewebszellen, wie sie im gesunden Organismus und in Autoimmunerkrankungen auftreten. Es werden Fragen der Toleranzinduktion durch orale Gabe von Antigenen, speziell der oralen Verabreichung von Collagen II bei Patienten mit rheumatoider Arthritis diskutiert. Eine Immundeviation als Mittel, inflammatorische Th1-Zellantworten in anti-inflammatorische Th2-Zellantworten zu verwandeln, kann durch Eingriffe in die T-Zell-Signaltransduktion erreicht werden. Es werden neue Ansätze zu Mechanismen diskutiert, die das Immunprivileg des Zentralnervensystems gewährleisten. Die hirnresidenten Immunzellen, zu denen Mikrogliazellen und Astrozyten zählen, besitzen Eigenschaften, die eine Entzündung unwahrscheinlich machen. Sie müssen aktiviert werden, um Antigene präsentieren zu können. In organotypischen entorhinal-hippocampalen Schnittkulturen konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen durch Th1-Zellen aktiviert, von Th2-Zellen hingegen deaktiviert werden. Die Möglichkeit, dass die Costimulation über CD80 oder CD86 differentielle Effekte auf den Charakter der Immunantwort hat, wird diskutiert. Der Einfluß von pro-inflammatorischen Zytokinen auf Mikrogliaaktivierung und den Erhalt von Nervenfasern wurde ebenfalls in Hirnschnittkulturen untersucht. Astrozyten sind wesentlicher Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke. Diese kann jedoch von aktivierten T-Zellen überwunden werden. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Astrozyten über eine Expression von CD95L in aktivierten T-Zellen Apoptose induzieren können. Davon sind jedoch nicht alle T-Zellen betroffen. Andererseits wird eine T-Zellproliferation unterdrückt, indem T-Zellen unter Astrozyteneinfluß verstärkt CTLA-4 exprimieren, was einen Zellzyklusarrest zur Folge hat. Darüber hinaus ist eine verstärkte Produktion von Nervenwachstumsfaktor (NGF; nerve growth factor) nach antigenspezifischer Interaktion von Astrozyten mit Th1- und Th2-Zellen als zusätzliches Mittel, eine Neuroinflammation einzudämmen, anzusehen. Die Arbeit stellt diese Ergebnisse in fünf Kapiteln dar, welche gleichzeitig eine Einführung in die als Anlagen enthaltenen zehn Publikationen geben.

Autoimmunerkrankungen, Toleranz, Immunprivileg, Th1, Th2, Astrozyten, Mikroglia, CD152, NGF, CD95L

Abstract

This thesis deals with T helper cells and their interactions with tissue cells as they occur in the healthy organism and in autoimmune diseases. Questions of tolerance induction by oral application of antigens are discussed especially oral treatment with type II collagen in patients with rheumatoid arthritis. In order to transform inflammatory Th1 responses into anti-inflammatory Th2 responses, immune deviation can be reached by interference with T-cell signal transduction. New approaches towards the different ways that the immune privilege of the central nervous system is maintained are discussed. The resident immune cells, i.e. microglia and astrocytes possess properties that make inflammation unlikely. They have to be activated in order to present antigens. It has been shown in organotypic entorhinal-hippocampal slice cultures that Th1 cells activate whereas Th2 cells deactivate microglial cells. The possibility is discussed as to whether costimulation via CD80 or CD86 differentially influences the character of the immune response. The influence of pro-inflammatory cytokines on microglial activation and preservation of nerve fibers has also been studied in brain slice cultures. Astrocytes are an essential part of the blood-brain barrier, which can be crossed by activated T cells. The thesis shows that astrocytes can induce apoptosis in activated T cells via expression of CD95L. However, not all T cells are affected. T cell proliferation is suppressed by increased CTLA-4 expression in T cells under the influence of astrocytes, resulting in a cell cycle arrest. An additional mechanism of confining neuroinflammation is increased production of the nerve growth factor (NGF) following antigen-specific interaction of astrocytes and Th1 and Th2 cells, respectively. These results are presented in five chapters that also introduce the ten attached publications.

autoimmune disease, tolerance, immune privilege, Th1, Th2, astrocytes, microglia, CD152, NGF, CD95L

1. Verzeichnis der zur kumulativen Habilitationsschrift zusammengefassten Anlagen	5
2. Die Funktion von T-Helferzellen im Immunsystem	7
3. T-Helferzellen in Autoimmunerkrankungen	13
3.1. Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen und deren Rolle in Autoimmunerkrankungen.....	13
3.2. Immunmodulation durch Eingriffe in die T-Zell-Signaltransduktion	14
3.3. Orale Toleranzinduktion als therapeutisches Mittel in Autoimmunerkrankungen.....	15
4. Differentielle Regulation von Immunprozessen im ZNS durch Mikrogliazellen und Astrozyten.....	19
4.1. Intrinsische anti-inflammatorische Eigenschaften des Hirns	19
4.2. Das Modell der entorhinal-hippocampalen Schnittkultur zur Untersuchung neuroimmunologischer Prozesse	21
5. Wechselwirkungen von T-Helferzellen mit Mikrogliazellen	25
5.1. Phagozytose von myelinisierten Nervenfasern durch aktivierte Mikrogliazellen - Rolle der Antigenspezifität der T-Zellen.....	25
5.2. Der unterschiedliche Einfluss polarisierter Th1- und Th2-Zell-Linien auf Mikrogliazellen – mögliche Erklärung einer neuroprotektiven Wirkung von Th2-Zellen in demyelinisierenden Erkrankungen	26
5.3. Wirkung von pro-inflammatorischen Zytokinen auf den Aktivierungszustand von Mikrogliazellen und den Gewebeerhalt im ZNS ..	30
6. Wechselwirkung von T-Helferzellen mit Astrozyten.....	41
6.1. Induktion von Apoptose in Th-Zellen durch FasL-exprimierende Astrozyten.....	41
6.2. Suppression von Th-Zellen durch Astrozyten-induzierte Hochregulation von CTLA-4	41
6.3. Vermehrte NGF-Produktion von Astrozyten nach Interaktion mit Th1- und Th2-Zellen.....	43
7. Zusammenfassung.....	45
8. Literaturverzeichnis anderer Autoren.....	47
9. Nicht in der Habilitationsschrift enthaltene eigene Arbeiten; im Text mit E: zitiert	61
Erklärung.....	62
Danksagung	64
Abkürzungsverzeichnis	66

1. Verzeichnis der zur kumulativen Habilitationsschrift zusammengefassten Anlagen

Anlage 1:

Gimsa, U. und N.A. Mitchison (1997) New perspectives on the Th1/Th2 paradigm. *Curr. Opin. Organ Transpl.* **2**: 18-22.

Anlage 2:

Gimsa, U., A. Mitchison, R. Allen (1999) Inhibitors of Src-family tyrosine kinases favour Th2 differentiation. *Cytokine* **11**: 208-215.

Anlage 3:

Gimsa, U., T. Kamradt, A. Mitchison, J. Sieper (1997) Autoimmunity and immunological privilege in the eye. In: Oculodermal diseases-immunology of Bullous Oculo-Muco-Cutaneous Disorders, Pleyer, U., Hartmann, C. und Sterry, W., Hrsg. (Buren, NL: Aelous Press), 33-42.

Anlage 4:

Gimsa, U., J. Sieper, J. Braun, N.A. Mitchison (1997) Type II collagen serology: a guide to clinical responsiveness to oral tolerance? *Rheumatol. Int.* **16**: 237-240.

Anlage 5:

Gimsa, U., S.A. Peter, K. Lehmann, I. Bechmann, R. Nitsch (2000) Axonal damage induced by invading T cells in organotypic central nervous system tissue *in vitro*: involvement of microglial cells. *Brain Pathol.* **10**: 365-377.

Anlage 6:

Gimsa, U., S.A. Wolf, D. Haas, I. Bechmann, R. Nitsch (2001) Th2 cells support intrinsic anti-inflammatory properties of the brain. *J. Neuroimmunol.* **119**: 73-80.

Anlage 7:

Wolf, S.A.*, U. Gimsa*, I. Bechmann, R. Nitsch (2001) Differential expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 on microglial cells induced by Th1 and Th2 cells in organotypic brain tissue. *Glia* **36**: 414-420. *gemeinsame Erstautorenschaft

Anlage 8:

Bechmann, I., B. Steiner, U. Gimsa, G. Mor, S. Wolf, M. Beyer, R. Nitsch, F. Zipp (2002) Astrocyte-induced T cell elimination is CD95 ligand dependent. *J. Neuroimmunol.* **132**: 60-65.

Anlage 9:

Gimsa, U., A. Øren, P. Pandiyan, D. Teichmann, I. Bechmann, R. Nitsch, M.C. Brunner-Weinzierl (2004) Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152). *J. Mol. Med.* **(im Druck)**

Anlage 10:

Øren, A., K. Falk, O. Röttschke, I. Bechmann, R. Nitsch, U. Gimsa (2004) T helper cells increase production of neuroprotective NGF in astrocytes. *J. Neuroimmunol.* **(im Druck)**

2. Die Funktion von T-Helferzellen im Immunsystem

Aufgabe des Immunsystems ist es, den Organismus vor Infektionen, aber auch Tumoren zu schützen. Diese Aufgabe wird bei Säugetieren durch den kombinierten Einsatz zweier Systeme realisiert, des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. Das evolutionär ältere und in der zeitlichen Reihenfolge der Immunabwehr erste System ist die angeborene Immunität. Sie wird durch verschiedene molekulare und zelluläre Spieler vermittelt. Zunächst verfügt der Organismus über physikalische und chemische Barrieren, wie Epithelien (z.B. Hornschicht der Haut mit Säureschutzmantel) und antimikrobielle Substanzen, welche an solchen epithelialen Oberflächen sezerniert werden, wie z.B. das Lysozym in der Tränenflüssigkeit, Defensine (anti-mikrobielle Peptide) in den Atemwegen [Kao, 03], der Haut [Kopp, 02; Thomma, 03], dem Urogenitaltrakt [Com, 03; Nitschke, 02], im Speichel [Tenovuo, 02] und den Tonsillen [Weise, 02] oder die Seruminhibitoren von Influenzaviren [Biddle, 66]; [Rogers, 83; Ryan-Poirier, 91] **E**: [Gimsa, 96]. Zu den molekularen Spielern zählen auch die im Blut vorkommenden Komplementproteine. Auf zellulärer Ebene wird die angeborene Immunität über phagozytische Zellen (Makrophagen, Neutrophile u.a.) realisiert. Diese Zellen phagozytieren und beseitigen eindringende Mikroorganismen und Viren, wozu sie zahlreiche Moleküle sezernieren. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle bei der Einleitung der adaptiven Immunantwort. Natürliche Killer- (NK) Zellen spielen vor allem bei der Abwehr von Viren eine Rolle, indem sie virusinfizierte Zellen erkennen und töten.

Der Name „adaptive Immunität“ verdeutlicht, dass es sich hier um die zweite Verteidigungslinie handelt, die speziell auf einen Erreger abgestimmt wird und seine charakteristischen Antigene im „Gedächtnis“ behält. Dadurch kann der Organismus auf eine wiederholte Exposition mit diesem Erreger spezifischer und heftiger reagieren als über die angeborene Immunität. Die adaptive Immunität wird durch T ($CD4^+$ und $CD8^+$)- und B-Lymphozyten vermittelt. Tabelle 1 erläutert die Ausprägung des Immunsystems bei den evolutionär unterschiedlich hoch entwickelten Organismen.

Tab. 1: Die Evolution des Immunsystems (nach Abbas et al. 2000)

	Angeborene Immunität			Adaptive Immunität	
	Phagozyten	NK-Zellen	Antikörper	T- und B-Zellen	Lymphknoten
Invertebrata					
Protozoa	+	-	-	-	-
Porifera	+	-	-	-	-
Anneliden	+	+	-	-	-
Arthropoden	+	-	-	-	-
Vertebrata					
Knorpelfische	+	+	+ (nur IgM)	+	-
Knochenfische	+	+	+ (IgM, andere?)	+	-
Amphibien	+	+	+ (2-3 Klassen)	+	-
Reptilien	+	+	+ (3 Klassen)	+	-
Vögel	+	+	+ (3 Klassen)	+	+ (manche Arten)
Säugetiere	+	+	+ 7-8 Klassen	+	+

Eine adaptive Immunantwort erfolgt antigen-spezifisch nach einer vorausgegangenen Antigen-Präsentation durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs; z.B. dendritische Zellen, Makrophagen). Welche Antigene erkannt werden, ist unter Umständen lebenswichtig. Es muß gewährleistet werden, dass eindringende Pathogene erkannt und bekämpft werden, körpereigenes Gewebe jedoch nur dann, wenn es entartet ist. Die klassische Immunologie geht von dem Postulat aus, das Immunsystem erkenne „fremd“ und ignoriere „eigen“ [Bretscher, 70; Janeway, Jr., 92; Medzhitov, 00; Janeway, Jr., 02; Medzhitov, 02]. Entsprechend einer neueren Hypothese unterscheidet das Immunsystem zwischen „gefährlich“ und „harmlos“, wobei die Gefahr (Danger) vom Gewebe signalisiert wird. Für diese „Danger“-Hypothese [Matzinger, 94; Anderson, 00; Anderson, 01; Matzinger, 02] spricht, dass das Immunsystem durchaus körpereigene Gewebe bekämpft, nämlich dann, wenn es sich um zu Tumoren entartete Zellen handelt; und fremde Zellen und Antigene toleriert, wenn sie oral oder nasal aufgenommen werden oder als Embryonen im Uterus heranwachsen. Diese Eigenschaften lassen sich jedoch auch im Rahmen des Fremd/Eigen-Modells erklären. Nach Medzhitov und Janeway [02] erfolgt die Antigenerkennung durch das angeborene Immunsystem über 3 verschiedene Signale: (1) „mikrobiell-fremde“ Signale, (2) fehlende „Eigen“-Signale und (3) veränderte „Eigen“-Signale. Zu (1) gehören das Lipopolysaccharid von gramnegativen und das Peptidoglykan von gram-positiven Bakterien. Als (2) gilt das durch einige Viren oder infolge einer erfolgten Zelltransformation herunterregulierte MHC-I-Molekül, was normalerweise konstitutiv auf allen kernhaltigen Zellen zu finden ist. Unter (3) versteht man z.B. Tumorzellen veränderte Antigene auf Tumorzellen, durch welche diese „fremd“ wirken. Beim Menschen sind zahlreiche Onkogene bekannt, die im Genom meist stumm vorhanden sind, im Falle ihrer Expression jedoch zum Tumor führen können. Diese Onkogene sind möglicherweise von Retroviren ins Genom eingetragen worden, insofern sind ihre Genprodukte also nicht einmal körpereigen. Zur Toleranz von oral und nasal aufgenommenen Antigenen und zum Schutz heranwachsender Embryonen haben sich

evolutionär zahlreiche Mechanismen herausgebildet, durch die das Immunsystem diese Antigene zwar nicht ignoriert, jedoch so auf sie reagiert, dass es zu keiner heftigen Immunreaktion kommt, die zu einer Schädigung des körpereigenen Gewebes bzw. des Embryos führen könnte. Eine in diesem Zusammenhang attraktive Annahme des „Danger“-Modells ist, dass das Gewebe die Immunantwort durch Beeinflussung der Lymphozyten selbst oder über die APCs kontrolliert, um sich vor Schäden zu schützen [Anderson, 00]. In dieses Konzept, mit dem das Immunprivileg einiger Gewebe erklärt wird, fügen sich die in dieser Arbeit dargestellten Resultate zu den besonderen Eigenschaften des ZNS gut ein (siehe 5.). Während die Transplantatabstoßung vom Fremd-Eigen-Modell direkt erklärt wird, geht das „Danger“-Modell davon aus, dass durch die Transplantation vom verletzten Gewebe „Danger“-Signale ausgesandt werden. Diese führen dann zur Immunantwort, deren Nebeneffekt die Transplantatabstoßung ist. Im Widerspruch dazu steht, dass der Verwandtschaftsgrad die Transplantatakteptanz beeinflusst. Nach dem „Danger“-Modell müsste es auch bei der Transplantation zwischen genetisch identischen Inzuchtmäusen zu einer Abstoßung kommen, da auch hier Verletzungen des Gewebes erfolgen. Das ist nicht der Fall. Beide Modelle stimmen darin überein, dass zur T-Zellaktivierung 2 Signale notwendig sind (das erste über den T-Zellrezeptor, das zweite über costimulatorische Moleküle) und dass diese Signale nur von aktivierten APCs ausgehen können, die diese costimulatorischen Moleküle exprimieren. Die beiden kontrovers diskutierten Modelle haben Stärken und Schwächen. Ich halte es jedoch für unangebracht, die komplexen Verknüpfungen aus evolutionär entstandenen Eigenschaften des Immunsystems und des von ihm überwachten Gewebes in ein ausschliesslich gültiges Modell pressen zu wollen, zumal die Pathogene mit dem Immunsystem in einem ständigen Wettrüsten stehen und ständig neue Strategien aufgedeckt werden, mit denen Erreger der Immunabwehr ausweichen. Darüber hinaus waren Organtransplantationen nicht in der Evolution „vorgesehen“.

Leider reagiert das Immunsystem nicht immer angemessen. Werden fremde/gefährliche Antigene ignoriert, ist keine adäquate Immunabwehr möglich. Lösen hingegen eigene oder harmlose Antigene eine heftige Immunantwort aus, kann es zu Autoimmunerkrankungen oder Allergien bzw. zur Abstoßung von Embryonen kommen. Die „Prägung“ der T-Zellen auf die Antigenerkennung erfolgt während der Ontogenese im Thymus, wo diese Zellen gebildet werden. Sie unterliegen zunächst einer positiven Selektion, welche nur die T-Zellen überleben, deren T-Zellrezeptor (T-cell receptor, TCR) in der Lage ist, mit den Haupthistokompatibilitätskomplexen (major histocompatibility complex, MHC) des Organismus zu interagieren. Danach erfolgt die negative Selektion, bei der solche T-Zellen aussortiert werden, die körpereigene Antigene erkennen. Diese autoreaktiven Zellen werden entweder durch klonale Deletion mittels Apoptose beseitigt oder durch klonale Anergie inaktiviert, so dass sie sich nicht vermehren können. Aufgrund einer komplizierten genetischen Regulation gibt es z.B. in der Maus etwa 10^8 verschiedene TCRs (klonotypisch verschiedene naive T-Zellen) [Michie, 88]. Nach Mason [98] gibt es jedoch wesentlich mehr auf MHC-II

präsentierbare Peptidantigene: Die Bindung eines Peptids an ein MHC-II-Molekül erfolgt über Ankermoleküle. Für das in den theoretischen Betrachtungen von Mason [98] exemplarisch verwendete Motten-Cytochrom C, welches an das MHC-II-Molekül I-E^k bindet, sind es 3 Aminosäuren. Experimentell können in diesem Peptid diese 3 Aminosäuren begrenzt ausgetauscht werden, um noch immer eine Bindung zu ermöglichen, und zwar gegen 4, 10 bzw. 7 von 20 möglichen essentiellen Aminosäuren. Damit ist die Anzahl aller möglichen Peptide, die über I-E^k präsentiert werden können, auf

$$\frac{4 \times 10 \times 7}{20^3}$$

beschränkt. Daraus lässt sich errechnen, dass nur etwa 3% der in der Natur möglichen 11-Aminosäuren-Peptide ein solches MHC-II-Bindungsmotiv haben [Mason, 98]. Wenn alle 20 Aminosäuren auf den 8 verbliebenen Plätzen zugelassen werden, so ergibt sich, dass etwa 6×10^{12} (3% von 20^{11}) verschiedene Peptide präsentiert werden können. Die Anzahl von TCR-Klonotypen, die das gleiche Peptid erkennen, wurde mit mindestens 5 bestimmt [McHeyzer-Williams, 95]. Unter Verwendung dieser Werte berechnet Mason [98] mit

$$N = 10^8 \times (20^{11} \times 0,03) / 5$$

die Anzahl von MHC-II-Peptidkomplexen, die von einem TCR erkannt werden, mit etwa 3×10^5 . Die optimale Peptidlänge für MHC-II-Moleküle ist jedoch >11. Die Anzahl präsentierbarer Peptide erhöht sich mit jeder zusätzlichen Aminosäure um den Faktor 20, so dass die tatsächliche Kreuzreaktivität der T-Zellen noch höher liegen muss [Mason, 98]. Diese hohe Kreuzreaktivität lässt nicht zu, dass alle autoreaktiven T-Zellen durch negative Selektion beseitigt werden können, da sonst eine Immunantwort auf fremde Antigene ebenfalls nicht mehr möglich wäre. Negativ selektiert werden können daher nur T-Zellen mit TCRs, die körpereigene Antigene mit hoher Avidität erkennen. Hieraus ergibt sich eine Präsenz von schwach autoreaktiven T-Zellen in jedem Organismus. Wie es zur Aktivierung dieser autoreaktiven T-Zellen (Durchbrechung der zentralen Toleranz) und einer darauffolgenden Autoimmunerkrankung kommt, ist bislang noch nicht vollständig verstanden. Wahrscheinlich spielen auch niedrig-affine Bindungen zwischen MHC-II und Peptid eine Rolle [Fairchild, 96].

Für Autoimmunerkrankungen können verschiedene Mechanismen verantwortlich sein. Zum einen können durch Fehler in den Selektionsprozessen autoreaktive T-Zellen der negativen Selektion entgangen sein, wofür es jedoch kaum experimentelle Befunde gibt. Zum anderen kann im Gewebe die Toleranz gegenüber Autoantigenen aufgehoben werden (Durchbrechung der peripheren Toleranz). Gewebs-APCs, präsentieren normalerweise Gewebs-Antigene so, dass diese nicht immunogen wirken, da diese APCs ohne Aktivierung keine costimulatorischen Moleküle exprimieren. Nun ist denkbar, dass diese APCs aktiviert werden, costimulatorische Moleküle exprimieren und dadurch autoreaktive T-Zellen aktivieren können. Ursache hierfür können Verletzungen oder Infektionen sein. Virale und bakterielle Infektionen können Autoimmunerkrankungen auslösen, indem sie durch Erzeugung lokaler Entzündungen

ruhende Gewebs-APCs aktivieren können (siehe oben) oder Gewebsantigene verändern, so dass Kreuzreaktivitäten entstehen oder selbst Antigene besitzen, mit denen vorhandene autoreaktive T-Zellen kreuzreagieren („molekulares Mimikry“; siehe 3.) [Abbas, 00]. Es können aber auch genetische Defekte auftreten, die die Regulation der Expression costimulatorischer oder apoptose-induzierender Moleküle verändern. Eine weitere Ursache kann der Verlust regulatorischer T-Zellen sein, welche normalerweise Autoimmunreaktionen unterdrücken. Genetische Faktoren haben mit Sicherheit Einfluss auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Die stärkste bekannte Korrelation gibt es zwischen Autoimmunerkrankungen und dem Auftreten bestimmter HLA-Allele (MHC-II) [Vyse, 96].

Bei der adaptiven Immunität unterscheidet man zwei Formen, die humorale, durch Antikörper vermittelte, und die zelluläre Immunität, die auf dem Abtöten infizierter Zellen beruht. Beide Formen benötigen die Hilfe von $CD4^+$ T-Helferzellen. Diese unterteilen sich klassisch in zwei Gruppen, die des Typs 1 (Th1) und die des Typs 2 (Th2) [Mosmann, 86]. Die Aufgabe der Th1-Zellen ist es, mit Hilfe des von ihnen produzierten Interferon (IFN)- γ , eine Aktivierung von $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen zu Effektorzellen einzuleiten, also die zelluläre Immunität zu vermitteln. Th2-Zellen unterstützen die Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen, also die humorale Immunität. Dabei spielt das von ihnen produzierte Interleukin (IL) -4 eine Schlüsselrolle. Darüber hinaus können beide Th-Typen durch Sekretion von Zytokinen (**Th1**: IFN- γ , Lymphotoxin (LT), Tumornekrose-Faktor (TNF)- α ; **Th2**: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) selbst Effektorfunktionen ausüben. Diese typischen Zytokinmuster werden vereinfachend als pro- (Th1) und anti-inflammatorisch (Th2) bezeichnet. Dass es sich hierbei um eine Vereinfachung handelt, wird deutlich, wenn man die Wirkung der einzelnen Zytokine in verschiedenen Krankheitsmodellen betrachtet. Bei Allergien und Asthma wirkt IL-4 durchaus entzündungsfördernd. Die Differenzierung einer naiven Th-Zelle in Richtung Th1 oder Th2 wird durch verschiedene Faktoren bestimmt. Den stärksten Stimulus stellen Cytokine dar: IL-12 und IFN- γ für Th1-Zellen, IL-4 für Th2-Zellen [Hsieh, 93; O'Garra, 93]. Darüber hinaus spielen Antigendosis, Stärke des T-Zellrezeptorsignals und des costimulatorischen Signals eine entscheidende Rolle [Constant, 97; Murphy, 00]. Neben den Th1- und Th2-Zellen sind noch weitere T-Helferzellen bekannt, die regulatorisch wirken und nach Antigenkontakt antigenspezifische Immunantworten aktiv unterdrücken. Eine Population dieser Zellen produziert IL-4, IL-10 und den Transformierenden Wachstumsfaktor- β (transforming growth factor- β ; TGF- β) und wurde als Th3-Zellen beschrieben. Eine ähnliche Population wurde als regulatorische T-Zellen des Typs 1 (Tr1) bezeichnet, welche IL-10-abhängig TGF- β produzieren [Kitani, 00]. Untersuchungen von Assenmacher et al. [98a] demonstrieren, dass die Einteilung in Th1, Th2 und Th3-Zellen eine Vereinfachung darstellt. Die Autoren konnten zeigen, dass auf Einzelzelebene im zeitlichen Verlauf der T-Zellaktivierung den verschiedenen Th-Typen zugeordnete Zytokine von ein- und derselben Zelle produziert werden können. Auf Populationsebene

handelt es sich jedoch offenbar um eine praktikable Vereinfachung. Sie wird in der laborexperimentellen Forschung angewandt, um grundlegende Unterschiede im Verhalten von Th1- und Th2-polarisierten Populationen zu beschreiben. In der klinisch-experimentellen Anwendung wird sie als Hinweis auf den Charakter der Immunantwort genutzt. So konnte bei Organtransplantationen eine starke Korrelation zwischen dem Auftreten einer Th1-Immunantwort und der Organabstoßung beobachtet werden, während eine Th2-Verschiebung oftmals mit einem Schutz des Transplantats vor einer Abstoßungsreaktion korreliert war (**Anlage 1**).

3. T-Helferzellen in Autoimmunerkrankungen

3.1. Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen und deren Rolle in Autoimmunerkrankungen

Je nachdem, ob nur ein Organ betroffen ist oder im Blut zirkulierende Immunkomplexe eine systemische Ausweitung der Erkrankung anzeigen, unterscheidet man organspezifische und systemische Autoimmunerkrankungen. Zu den organspezifischen Autoimmunerkrankungen gehören die Multiple Sklerose (MS), bei der es zu einer autoimmunen Demyelinisierung von Axonen des ZNS kommt, der Insulin-abhängige Diabetes mellitus (IDDM), bei dem die pankreatischen Inselzellen zerstört werden und andere. Zu den systemischen Immunerkrankungen zählt man z.B. den Systemischen Lupus erythematodes (SLE), der durch Autoantikörper gegen ubiquitäre Antigene, u.a. DNS, gekennzeichnet ist, und die Rheumatoide Arthritis (RA), bei der zunächst Gelenkknorpelstrukturen, bei schwerem Verlauf jedoch fast alle Organe betroffen sein können [Marrack, 01]. MS, RA und IDDM sind T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen.

In Autoimmunerkrankungen dominiert im allgemeinen eine Immunantwort entweder des einen oder des anderen Th-Phänotyps. Bei Autoimmunerkrankungen, bei denen Antikörper eine pathogene Rolle spielen, überwiegt der Einfluss von Th2-Zellen. Hingegen dominieren bei entzündlichen Autoimmunerkrankungen, bei denen Antikörper im Gegensatz zu T-Zellen nur eine untergeordnete oder keine Rolle spielen, Th1-Zellen (Abb. 1).

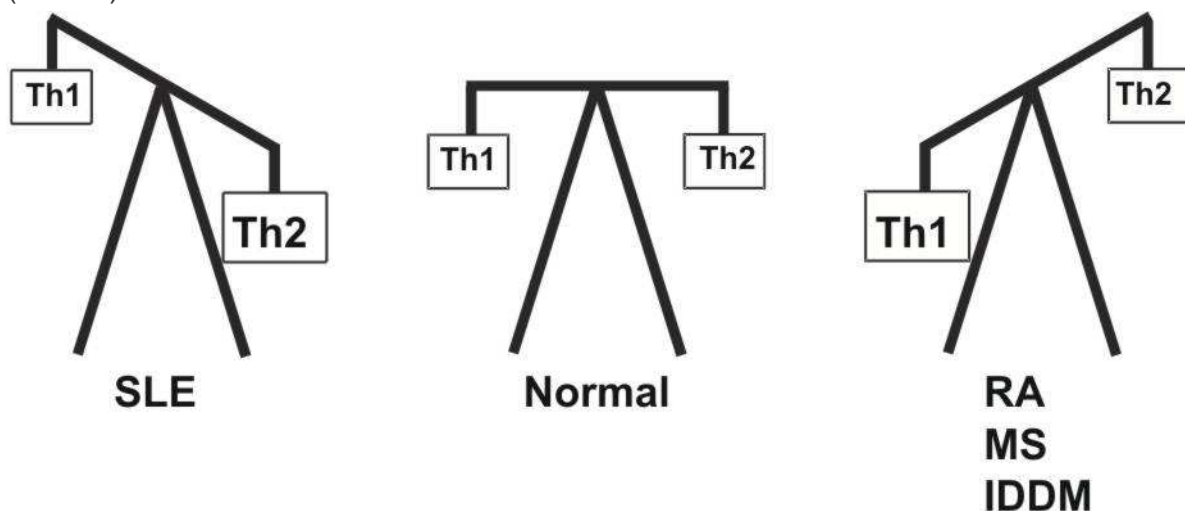


Abb. 1: Dominanz verschiedener Th-Phänotypen in Autoimmunerkrankungen im Vergleich zum gesunden Organismus

3.2. Immunmodulation durch Eingriffe in die T-Zell-Signaltransduktion

Es stellt sich die Frage, ob die Dominanz des Th1-Phänotyps in Erkrankungen wie RA und MS selbst pathogen oder nur ein Zeichen der Erkrankung ist. Um diese Frage experimentell beantworten zu können, wären immunmodulatorische Wirkstoffe, die Immunantworten vom Th1- zum Th2- Phänotyp verschieben könnten, von großem Interesse. Eine solche Verschiebung ist bei ausdifferenzierten T-Helferzellen nur bedingt möglich [Murphy, 96; Hu-Li, 97; Assenmacher, 98b; Coffman, 99]. Es ist jedoch denkbar, in einen Autoimmunprozess derart einzugreifen, dass neu rekrutierte, noch naive T-Zellen in Richtung Th2-Differenzierung gelenkt werden, und die so erzielbare Verschiebung der Th1/Th2- Balance therapeutisch zu nutzen, um eine pathologische Th1-Dominanz zu korrigieren. Die oben erwähnte Möglichkeit der Th2-Polarisierung durch IL-4 ist jedoch therapeutisch aus Kostengründen, ungünstiger Pharmakokinetik und zu erwartender nachlassender Effizienz auf Grund von Immunreaktionen schwer nutzbar. Eine niedermolekulare Substanz hätte diese Nachteile nicht. Einige Therapeutika, wie der β -Adrenorezeptor-Agonist Salbutamol [Coqueret, 94], das Psoriasismedikament Monomethylfumarat [de Jong, 96] und das Immunsuppressivum Thalidomid [McHugh, 95] induzieren eine Th2-Verschiebung in verschiedenen Systemen (**Anlage 1**). Weitere Möglichkeiten der Modulation der Th1/Th2-Balance von Autoimmunerkrankungen haben wir 1998 zusammenfassend dargestellt **E**: [Müller, 98]. Wie bereits erwähnt, entscheidet u.a. die Stärke des TCR-Signals über eine Differenzierung in Richtung Th1 oder Th2, wobei ein stärkeres Signal die Th1-Differenzierung fördert, während eine Abschwächung des Signals eine Th2-Differenzierung bevorzugt [Constant, 97]. Dieses Konzept wurde durch veränderte Peptidliganden („altered peptide ligands“) bestätigt, welche z.B. bei MS eine Th2-Verschiebung bewirken, allerdings mit dem Risiko antikörpervermittelter Überempfindlichkeitsreaktionen [Kappos, 00]. Zur Cholesterolsenkung eingesetzte Statine greifen in die MHC-II-Expression ein und induzieren im Tiermodell der MS, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) eine Th2-Verschiebung [Youssef, 02; Aktas, 03]. MHC-II-Promotorpolymorphismen sind verantwortlich für eine unterschiedlich starke Expression von MHC-II-Molekülen. Es gibt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen geringer MHC-II-Expression und einer Bevorzugung von Th2-Immunantworten [Mitchison, 99]. Auf der Basis dieses Signalstärkekonzeptes haben wir untersucht, ob Eingriffe in die T-Zell-Signaltransduktion durch Hemmung der Tyrosinkinase Lck aus der Src-Familie einen Einfluss auf die Th-Phänotypdifferenzierung hat. Dazu wurde ein *in vitro*-System mit Lymphozyten transgener Mäuse, deren T-Helferzellen einen TCR für ein Ovalbuminpeptid besitzen, genutzt. Es wurden Lck-Inhibitoren gefunden, die in der Lage sind, die Immunantwort in Richtung Th2 zu verschieben, was sich als dosisabhängige Zunahme der IL-4-Produktion bei gleichzeitiger Abnahme der IFN- γ -Produktion ausdrückte (**Anlage 2**; Fig. 1 und Tab.1). Aus dieser Arbeit ging unter anderem ein Patent hervor **E**: [Gimsa, 97]. Der beobachtete Effekt war IL-4-abhängig und konnte durch IL-12 rückgängig gemacht

werden (**Anlage 2**; Fig. 2). Die Inhibitoren der Src-Tyrosinkinasefamilie waren besonders effektiv, wenn gleichzeitig bestimmte anti-CD4-Antikörper anwesend waren. Anti-CD4-Antikörper wirkten jedoch nur dann synergistisch zu den Inhibitoren der Src-Tyrosinkinasefamilie, wenn sie die membrannahen Domänen 3 und 4 des CD4-Moleküls erkannten (**Anlage 2**; Tab. 2). Eine gezielte Erzeugung und Nutzung solcher Antikörper könnte in der Zukunft zu einem Aufschwung des therapeutischen Einsatzes von anti-CD4-Antikörpern bei Organtransplantationen (**Anlage 1**) und bei RA [Schulze-Koops, 98; Schulze-Koops, 00] führen. An der immunmodulatorischen Wirkung der Tyrosinkinaseinhibitoren ist vermutlich eine Störung der CD40-CD40L- Wechselwirkung beteiligt, da eine starke Hemmung der CD40L-Expression auf CD4-T-Zellen beobachtet wurde (**Anlage 2**; Fig. 3). Letzteres bewirkt wahrscheinlich eine reduzierte IL-12-Sekretion durch die APC [Ruedl, 00]. Diese Wirkung der Tyrosinkinaseinhibitoren könnte von Interesse für die Therapie von RA sein. So wurde eine starke funktionelle Expression von CD40L bei T-Zellen in der Synovialflüssigkeit beobachtet, die für die Aufrechterhaltung der Synovitis (Entzündung der Synovialmembran) verantwortlich sein soll [MacDonald, 97]. Eine Th2-Verschiebung durch CD40L-Blockade wurde *in vivo* in der EAE bestätigt [Samoilova, 97]. Die von uns untersuchten Tyrosinkinaseinhibitoren konnten eine Th1-Differenzierung jedoch nicht umkehren (**Anlage 2**; Fig. 4). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da mit jeder Stimulation unter polarisierenden Bedingungen die Reversibilität des Phänotyps abnimmt [Murphy, 96], wobei Th1-Zellen schneller einen stabilen Phänotyp erreichen als Th2-Zellen [Hu-Li, 97].

Ein möglicher therapeutischer Einsatz von Immunmodulatoren wird jedoch dadurch limitiert, dass diese Wirkstoffe nicht antigen-spezifisch wirken. Dadurch könnte es zu einer systemischen Verschiebung der Immunantwort kommen, welche die Gefahr einer verminderten zellulären Immunabwehr birgt.

3.3. Orale Toleranzinduktion als therapeutisches Mittel in Autoimmunerkrankungen

Wie es zum Bruch der Toleranz gegenüber Autoantigenen kommt, ist noch weitgehend unverstanden. Sowohl genetische Faktoren als auch Infektionen können eine Rolle spielen (siehe 1.). Als Mechanismus für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen aus Infektionen vermutet man eine Aktivierung von T-Zellen durch Antigene des infektiösen Agens, welche große Ähnlichkeit mit körpereigenen Antigenen aufweisen. Dieses „molekulare Mimikry“ soll dann zu einem Angriff auf körpereigene Antigene führen. Ob sich so eine Autoimmunerkrankung entwickelt, die sich auch nach der Beseitigung des infektiösen Agens verselbständigt und chronifiziert oder ob das auslösende fremde Antigen weiter im Körper persistieren muss, um die Immunreaktion aufrechtzuerhalten, ist bisher ungeklärt (**Anlage 3**). Für einige Erkrankungen ist jedoch eine Persistenz des Antigens sehr wahrscheinlich. In diesem Falle muss das

therapeutische Ziel die Beseitigung des Mikroorganismus oder Virus sein. Bei Krankheiten wie RA, wo ein solcher Erreger nicht bekannt ist, wird heute therapeutisch vor allem die Entzündung bekämpft, obwohl eine Wiederherstellung der Toleranz weitaus wünschenswerter wäre.

Bei der RA führt die chronische Entzündung der Gelenke zu einer Zerstörung des Knorpelgewebes. Sie ist gekennzeichnet durch eine Infiltration des Knorpelgewebes durch T-Lymphozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten. Es konnte sogar gezeigt werden, dass sich im Synovialgewebe lymphgewebsähnliche Strukturen, sogenannte Keimzentren bilden [Kim, 99]. Das verantwortliche Autoantigen ist nicht bekannt. Viele Proteine gelten als Kandidaten-Autoantigene. Dazu zählen Collagen Typ II [Cremer, 98; Ohnishi, 03; Backlund, 02; Rudolphi, 97], Proteoglycane [Glant, 80; Boots, 97] und das Hitzeschockprotein hsp60 [Zou, 02; Rudolphi, 97; Celis, 97], wobei letzteres Homologien zu vielen anderen Autoantigenen besitzt [Jones, 93]. Durch Etablierung von T-Zell-Linien aus peripherem Blut von RA-Patienten haben wir Collagen Typ II als mögliches Autoantigen untersucht. Nur wenige T-Zell-Linien zeigten eine beschränkte antigen-spezifische Proliferation bei Stimulation mit Collagen II oder Peptiden des Collagen II (**Anlage 4**). Andere Gruppen haben ähnliche Ergebnisse erzielt, womit das Konzept von Collagen II als möglichem Autoantigen in RA einmal mehr in Frage gestellt wurde. Viele der hypothetischen Autoantigene sind fast ausschließlich im Knorpelgewebe lokalisiert. Unabhängig davon, ob einzelne Antigene tatsächlich die auslösenden Autoantigene sind, können im Fortschreiten der Erkrankung weitere Antigene Immunantworten auslösen und an der Entzündung beteiligt sein. Dieses Phänomen wird „Epitope spreading“ genannt. Umgekehrt kann man diese Erscheinung nutzen, um T-Zellen mit einer Spezifität für solche Antigene therapeutisch einzusetzen. Es gibt Anstrengungen, diese T-Zellen *ex vivo* mit anti-inflammatorischen Zytokinen, z.B. IL-10 zu transfizieren.

Eine weniger komplizierte und vermutlich ungefährlichere Methode ist die Induktion einer „oralen“ oder „nasalen Toleranz“. Hierbei nutzt man den Effekt, dass die auf „natürlichem Wege“ (oral oder nasal) aufgenommenen Antigene, z.B. tierische oder pflanzliche Proteine, vom Immunsystem toleriert werden. Diese Toleranz beruht nicht einfach auf einer Ignoranz der Antigene, sondern vielmehr auf einer immunsuppressiven Immunantwort der Mucosa. Diese wird vermutlich durch TGF- β produzierende Tr1-Zellen oder $\gamma\delta$ -T-Zellen vermittelt [Weiner, 01; Krause, 00]. $\gamma\delta$ -T-Zellen besitzen weder CD4 noch CD8 als Corezeptor des TCR. Der TCR dieser Zellen besteht auch nicht, wie bei CD4+ und CD8+ T-Zellen aus α und β -Kette sondern aus einer γ und einer δ Kette. Sie sind nicht MHC-restringiert, erkennen zum Teil Nichtpeptidantigene und wirken antibakteriell. Sie machen 50% der residenten T-Zellen im Dünndarmepithel aus. Über ihre biologische Funktion ist nur wenig bekannt. Die Idee der Induktion einer „oralen Toleranz“ zielt darauf, dass solche T-Zellen den Darm verlassen, in das von einer Autoimmunreaktion betroffene Zielgewebe wandern und dort die Immunantwort unterdrücken. Als orales, toleranzinduzierendes Antigen sollte

also ein möglichst nur im Zielgewebe vorkommendes Protein genommen werden. Im Falle der RA gab es zwei klinische Studien in Boston [Trentham, 93] und in Berlin [Sieper, 96], in denen RA-Patienten Collagen Typ II oral verabreicht wurde. Während die Bostoner Studie signifikante Verbesserungen im klinischen Bild der RA-Patienten erzielte, gab es bei der Berliner Studie relativ wenige auf die Therapie ansprechende Patienten. Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Art des Antigens sein. Während in Boston Rindercollagen Typ II verwendet wurde, bestand in Berlin aufgrund der allgemeinen Besorgnis gegenüber Rinderbestandteilen wegen der Infektionsgefahr mit Boviner Spongiformer Enzephalopathie (BSE) die Notwendigkeit, Hühnercollagen Typ II zu verwenden. Ein weiteres Problem stellt die Aufnahme des Proteins dar. Collagen Typ II ist nur im sauren Milieu löslich. Inwieweit dadurch Antigene verändert werden, lässt sich nur schwer einschätzen. Darüber hinaus ist der Magen-Darm-Trakt vieler RA-Patienten auf Grund nichtsteroidaler anti-inflammatorischer Medikamente (NSAID) geschädigt, so dass eine Antigenaufnahme über die Schleimhäute erschwert ist. Es stellt sich auch die Frage, warum, wenn eine solche Toleranzinduktion möglich sein sollte, sie nicht auch durch die Aufnahme üblicher Nahrungsmittel, in denen tierisches Collagen Typ II zu finden ist, ausgelöst wird. Dies könnte jedoch an einer in der Regel zu geringen und unregelmäßig aufgenommenen Dosis liegen. Darüber hinaus ist auch hierbei eine Veränderung der Antigene durch die Magensäure nicht auszuschließen **E:**[Mitchison, 95].

Nach dem auf einzelne Patienten beschränkten Erfolg der Berliner Studie galt es herauszufinden, ob es für die Patientenauswahl vor Beginn einer solchen Therapie schon Kriterien gäbe, anhand derer von einem vorteilhaften Ansprechen auf die Therapie ausgegangen werden kann (**Anlage 4**). Da bei den Patienten durch orale Gabe von Collagen Typ II eine Veränderung der Immunantwort gegenüber Collagen Typ II induziert werden sollte, lag es nahe, nach Veränderungen im Autoantikörpertiter gegen Collagen Typ II zu suchen. Dazu wurden Patientenserum aus der Berliner Studie getestet, welche vor Beginn der Behandlung, unmittelbar nach der 12-wöchigen Behandlung und 6 Monate nach Abschluß der Behandlung gewonnen wurden. Die Studie erfolgte doppelt-blind in 3 Gruppen mit jeweils 30 Patienten. Die erste Gruppe erhielt ein Placebo, die zweite 1mg Collagen Typ II pro Tag, die dritte Gruppe erhielt 10mg Collagen Typ II pro Tag. Während in der Placebo-Gruppe 4 Patienten klinische Verbesserungen zeigten, waren es in der 1mg-Gruppe 6 und in der 10mg-Gruppe 7. Vor Beginn der Therapie gab es zwischen den Gruppen keine Unterschiede im vorhandenen anti-Collagen II- Antikörpertiter (**Anlage 4**; Tab. 1). Auch nach der Therapie unterschieden sich die mittleren Antikörpertiter der 3 Gruppen nicht signifikant. Es konnte jedoch im Laufe von 6 Monaten nach Behandlungsende eine signifikante Abnahme der Antikörpertiter innerhalb der Responder der 10mg-Gruppe festgestellt werden (**Anlage 4**; Fig. 2). Offenbar sind anti-Collagen II-Antikörper nicht als prospektives Kriterium nutzbar, wohl aber als Hinweis darauf, ob eine Therapie anspricht, d.h. die Immunantwort beeinflusst wird, und damit möglicherweise als Einschlußkriterium für eine Fortsetzung dieser Therapieform.

Gelenkknorpel und ZNS haben gemein, dass beide im gesunden Organismus weitgehend von der Immunüberwachung ausgeschlossen sind. Dies wird über verschiedene anatomische und molekulare Mechanismen realisiert, die im Normalfall eine Toleranz gegenüber ihren Gewebsantigenen sichern. Kommt es jedoch zum Bruch der Toleranz, haben die entstehenden Autoimmunerkrankungen RA und MS wiederum gemein, dass sie Th1-vermittelte Erkrankungen sind, bei denen inflammatorische Zytokine, wie z.B. $\text{TNF-}\alpha$ eine entscheidende Rolle spielen. Da diese Zytokine nicht ausschließlich von T-Zellen produziert werden, macht es Sinn, gewebsspezifische Zellen in die Untersuchungen der pathologischen Mechanismen einzubeziehen. In den folgenden Kapiteln soll daher auf diesen und andere Aspekte der Interaktion von T-Zellen mit Mikrogliazellen und Astrozyten eingegangen werden.

4. Differentielle Regulation von Immunprozessen im ZNS durch Mikrogliazellen und Astrozyten

4.1. Intrinsische anti-inflammatorische Eigenschaften des Hirns

Das ZNS nimmt in der Immunabwehr des Organismus einen besonderen Platz ein; es besitzt ein "Immunprivileg". Die Blut-Hirn-Schranke, welche durch eine besonders undurchlässige Barriere aus Endothel und Astrozytenfortsätzen, der Glia limitans, gebildet wird, schirmt das ZNS entsprechend der klassischen Sicht vor Infektionen, aber auch vor der normalen Immunüberwachung ab. Seit den Arbeiten von Wekerle [86] und Hickey et al. [91] ist jedoch klar, dass aktivierte T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Darüber hinaus besitzt das ZNS-Gewebe Eigenschaften, die man als "immunsuppressiv" bezeichnen könnte. Diese sind essentiell, da Entzündungen im ZNS infolge einer Immunreaktion aufgrund der besonderen Empfindlichkeit von Neuronen und der begrenzten Regenerierbarkeit des Gewebes schwere, irreversible Schäden hervorrufen können. Die Immunsuppression wird auf verschiedene Weisen realisiert. Zum einen gibt es nur eine eingeschränkte Immunabwehr durch Leukozyten aus der Peripherie, da nur aktivierte T-Zellen die Blut-Hirnschranke überwinden können. Zum anderen sind die residenten Immunzellen, Mikrogliazellen und Astrozyten, nicht wirklich "immunkompetent". Sie befinden sich in einem Ruhezustand, in dem sie kein Antigen präsentieren können. CD4⁺ T-Lymphozyten kann nur von aktivierten Astrozyten und Mikrogliazellen Antigen über MHC-II an präsentiert werden. Astrozyten sind selbst nach Aktivierung nicht in der Lage, Proteinantigene zu prozessieren, können also nur zuvor aufgenommene Peptidantigene präsentieren [Aloisi, 98]. Während Mikrogliazellen unter verschiedenen Aktivierungsbedingungen insbesondere an der Glia limitans [Lassmann, 91] *in vivo* MHC-II bereitwillig exprimieren, wurde es auf Astrozyten nur bei chronischen Entzündungen, wie z.B. in aktiven MS-Plaques nachgewiesen [Zeinstra, 00]. Kommt es zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten, wie z.B. bei der Entzündung in der MS oder bei einer Verletzung oder Infektion sind sowohl Mikrogliazellen als auch Astrozyten in der Lage, eine Vielzahl von Zytokinen und anderen löslichen Wirkstoffen zu produzieren und mit infiltrierenden Lymphozyten in Wechselwirkung zu treten.

Dennoch gibt es entscheidende Unterschiede zwischen Mikrogliazellen und Astrozyten. Aktivierte Mikrogliazellen sind eher vergleichbar mit Makrophagen der Peripherie, sie phagozytieren, prozessieren und präsentieren Proteinantigene. Darüber hinaus produzieren sie pro-inflammatorische Zytokine und Mediatoren wie IL-12, TNF- α , IL-1 β und NO [Coltman, 96; Aloisi, 99b; Boje, 92]. Sie sind in der Lage, antigen-spezifische T-Zellen zu restimulieren, d.h. sie erneut zu aktivieren und ihre Proliferation zu induzieren [Aloisi, 99b], sowie neue Lymphozyten aus der Peripherie durch die Sekretion von Chemokinen zu rekrutieren [Hayashi, 95]. Demgegenüber verhalten sich aktivierte Astrozyten eher widersprüchlich. Einerseits sezernieren sie als Antwort auf

inflammatorische Stimuli wie dem bakteriellen LPS pro-inflammatorische Zytokine und Mediatoren wie $\text{TNF-}\alpha$ und NO, andererseits produzieren sie neurotrophe Substanzen wie den Insulin-like growth factor (IGF) [Eddleston, 93] und den Nerve growth factor (NGF) [Glabinski, 96; Brodie, 98] als Antwort auf verletzungsbedingte Entzündungen, sowie anti-inflammatorische Zytokine und Mediatoren wie $\text{TGF-}\beta$ und Prostaglandin (PGE_2), die eine Entzündung unterdrücken [De Groot, 99; Palma, 97]. NGF hemmt die Induzierbarkeit der MHC-II-Expression durch Mikroglia [Neumann, 98]. $\text{TGF-}\beta$ gilt als ein Element des Immunprivilegs des ZNS. Es unterdrückt die aktivierungsabhängige Expression des costimulatorischen Moleküls CD40 auf Mikroglia [Nguyen, 98], vermindert die Rekrutierung von Lymphozyten ins ZNS [Fabry, 95] und unterdrückt die T-Zellaktivierung [Prud'homme, 00]. Darüber hinaus schützen Astrozyten Neurone vor glutamatinduzierter Neurotoxizität [Ye, 98] und produzieren das Scavenger-Molekül Glutathion, welches freie Radikale und reaktive Sauerstoffverbindungen unschädlich macht. Diese Eigenschaften von Astrozyten lassen ein neuroprotektives Potential erkennen.

Astrozyten scheinen ein großes Potential zu besitzen, die Aktivierung von Mikrogliazellen zu unterdrücken. Zum Beispiel hemmen sie die Endotoxin-induzierte NO-Produktion in Mikroglia [Tran, 97]. Allerdings sind Astrozyten selbst Produzenten von NO im ZNS [Chao, 96]. Dass dieses NO unter Umständen nicht neurotoxisch wirkt, liegt vermutlich an der gleichzeitigen Produktion von Glutathion, einem Scavenger, der NO unschädlich macht [Stone, 99]. Auf der anderen Seite kann NO nach neueren Befunden unter Umständen auch direkt neuroprotektiv wirken [Willmot, 03; Bonthius, 03; Guevara, 02; Gisone, 03]. Zu den protektiven Eigenschaften von Astrozyten gehört weiterhin ihre Fähigkeit, das Auswachsen von Oligodendrozytenfortsätzen durch Basic fibroblast growth factor (bFGF) und andere, bisher nicht identifizierte Oberflächenmoleküle zu fördern [Oh, 96].

Die $\text{IFN-}\gamma$ -induzierte MHC-II Expression in Astrozyten, jedoch nicht die in Mikrogliazellen wird durch Noradrenalin gehemmt. Dieser Effekt wird über die Aktivierung β_2 -adrenerger Rezeptoren und eine darauffolgende cAMP-Bildung vermittelt [Frohm, 88]. Astrozyten in normalem Hirngewebe besitzen β -adrenerge Rezeptoren [Mantyh, 95; Sutin, 92], die in MS-Gewebe jedoch fehlen [De Keyser, 99]. Es gibt jedoch auch Belege für eine direkte Förderung des neuroprotektiven Repertoires von Astrozyten durch Th2-Zellen bzw. deren Zytokine. Astrozyten sind die Hauptquelle für NGF, sie produzieren es nach Kontakt mit IL-4 und IL-10, während $\text{IFN-}\gamma$ die IL-10-induzierte NGF-Produktion hemmt [Brodie, 96]. Astrozyten besitzen funktionelle IL-4 Rezeptoren; in *in vitro* Versuchen hemmte IL-4 die Astrozytenaktivierung, d.h. die Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ und NO sowie die Expression der induzierbaren NO-Synthetase und des Adhäsions- und costimulatorischen Moleküls ICAM-1 [Brodie, 98].

Geht man von einem überwiegend protektiven Einfluss von Astrozyten aus, könnte ihr Absterben neurodegenerative Prozesse zur Folge haben. Tatsächlich wurde ein Toxin beschrieben, das im Liquor von MS-Patienten vorkommen soll und toxisch auf Astrozyten sowie Oligodendrozyten und Neurone wirkt. Dieses Toxin ist jedoch bisher nicht identifiziert und wird in der Literatur kontrovers diskutiert [Alcazar, 00; Alcazar, 98; Menard, 98; Menard, 97].

Neuere Untersuchungen weisen auf ein differenziertes Verhalten von Mikrogliazellen und Astrozyten gegenüber den T-Helferzell-Subtypen Th1 und Th2 und ihren Zytokinen hin. Während Mikrogliazellen IL-12 produzieren, welches den Hauptstimulus zur Th1-Differenzierung darstellt und Th2-Zellen unterdrückt, sind Astrozyten dazu nicht in der Lage, wodurch Astrozyten Th2-Zellen indirekt fördern. Darüber hinaus wird die IL-12-Produktion von Mikrogliazellen sogar durch Astrozyten gehemmt [Aloisi, 97]. Folgerichtig restimulieren Mikrogliazellen Th1-Zellen effektiver als Astrozyten. Umgekehrt werden Th2-Zellen von Astrozyten besser restimuliert als von Mikrogliazellen [Aloisi, 99b]. Das Th1-Zytokin IFN- γ bewirkt eine Expression von MHC-II auf Mikrogliazellen und Astrozyten *in vitro*. Weiterhin induziert es die Expression der costimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 auf Mikrogliazellen und Astrozyten, wobei die astrozytäre B7-Expression kontrovers diskutiert wird [Aloisi, 99a; Aloisi, 00]. Darüber hinaus induziert IFN- γ die PGE₂-Produktion in Astrozyten und Mikrogliazellen, wodurch es zu einer negativen Rückkopplung für Th1-Zellen und Mikrogliazellen kommt, da diese von PGE₂ unterdrückt werden [Aloisi, 99a]. Über die Unterdrückung der Th1-Differenzierung wirkt PGE₂ außerdem fördernd auf die Th2-Differenzierung [Wu, 98; Abe, 97; Katamura, 95; Pouw-Kraan, 95; Demeure, 97]. In ähnlicher Weise werden Astrozyten von anderen pro-inflammatorischen Zytokinen beeinflusst. TNF- α bewirkt eine Expression von MCP-1 durch Astrozyten. Dieser Prozeß wird durch IFN- γ verstärkt [Barna, 94; Hayashi, 95]. Dieses Chemokin rekrutiert Th1, vor allem jedoch Th2-Zellen, während das von Mikrogliazellen produzierte MIP-1 α überwiegend Th1-Zellen rekrutiert [Siveke, 98].

Aus all diesen Befunden ergab sich für mich die Arbeitshypothese, dass Astrozyten als Gegenspieler von Mikrogliazellen fungieren, um Entzündungen, in die Th1-Zellen und Mikrogliazellen involviert sind, schnellstmöglich herunterzuregulieren.

4.2. Das Modell der entorhinal-hippocampalen Schnittkultur zur Untersuchung neuroimmunologischer Prozesse

Das ZNS ist durch die Blut-Hirn-Schranke weitgehend von der Peripherie abgeschottet. Damit ist die Blut-Hirn-Schranke ein wesentlicher Bestandteil des Immunprivilegs. Seit den Arbeiten von Wekerle et al. [86] und Hickey et al. [91] ist jedoch klar, dass diese Barriere von aktivierten T-Lymphozyten nicht nur bei neuroinflammatorischen

Erkrankungen überwunden wird, sondern dass aktivierte T-Zellen unabhängig von ihrer Antigenspezifität über die intakte Blut-Hirn-Schranke in das ZNS eindringen, bei Abwesenheit möglicher Antigene das ZNS jedoch wieder verlassen. Zur Untersuchung der Interaktion solcher aktivierter T-Zellen mit Mikrogliazellen wurde eine organotypische entorhinal-hippocampale Schnittkultur genutzt.

Dieses *in vitro*-System ermöglicht über längere Zeit das Studium eines myelinisierten Fasertraktes mit erhaltenen Ursprungsneuronen und Zielzellen in einem organotypischen Gewebeverband [Diekmann, 94]. Eine Analyse der Morphologie von Mikrogliazellen und ihrer Expression von Adhäsionsmolekülen ergab, dass die Mikrogliazellen nach der anfänglichen, explantationsbedingten Aktivierung nach 6-9 Tagen *in vitro* in den inneren Schichten der Schnitte zur Ruhe kamen, wobei sie in den äußeren Schichten aktiviert blieben. Als Ausdruck dessen behielten letztere ihre amöboide Morphologie bei, während ruhende Mikrogliazellen eine ramifizierte Morphologie aufweisen. Darüber hinaus exprimierten sie die Adhäsionsmoleküle LFA-1 und VLA-4, die vergleichbar denen aktivierter Mikrogliazellen *in vivo* waren [Hailer, 96]. Bei einer experimentell induzierten neuronalen Schädigung durch NMDA migrierten mit MiniRuby® vormarkierte Mikrogliazellen in die organotypische Hirnschnittkultur hinein und steuerten spezifisch den Ort neuronaler Schädigung an [Heppner, 98]. Zur Untersuchung von Schädigungen des myelinisierten Fasertraktes zwischen entorhinalem Cortex und Hippocampus, dem *Tractus perforans*, wurde dieser vor der Schädigung mit MiniRuby® markiert. Dabei zeigte sich, dass Läsionen des *Tractus perforans in situ* zur Aktivierung von Gliazellen und zur Phagozytose von axonalem Material führen [Kluge, 98].

Diese Hirnschnittkultur wurde durch mich genutzt, um T-Zell-vermittelte Immunreaktionen in ZNS-Gewebe *in vitro* zu modellieren. Die potentiellen Effekte können auf verschiedenen Mechanismen beruhen: 1. Effekte durch direkte zelluläre Interaktionen; 2. Effekte durch Zytokine, welche die aktivierten T-Lymphozyten produzieren, 3. zelluläre Effekte durch andere Zellen, welche durch T-Lymphozyten nach zellulärem Kontakt oder durch deren Zytokine aktiviert wurden, sowie 4. Effekte durch Zytokine/Mediatoren, welche von anderen Zellen produziert werden, nachdem diese mit T-Lymphozyten interagiert haben. Um solche Mechanismen zu ergreifen, wurden Untersuchungen mit T-Zellen verschiedener Antigenspezifität (unspezifisch aktivierte Wildtyp-T-Zellen; MBP-spezifisch; Ovalbumin-spezifisch), mit oder ohne direkten Kontakt, oder mit rekombinanten Zytokinen, die typischerweise entweder von Th1-Zellen oder Mikrogliazellen produziert werden, durchgeführt. Von besonderem Interesse waren für mich Cokulturen der Hirnschnittkulturen mit MBP-spezifischen Th1- und Th2-Zellen. In der Literatur finden sich unterschiedliche Aussagen zur Rolle von Th2-Zellen bei der EAE. Zahlreiche Studien belegen den enzephalitogenen Charakter von myelin-spezifischen Th1-Zellen. Dagegen wird die Rolle der Th2-Zellen kontrovers diskutiert. Sie sind im Allgemeinen nicht enzephalitogen [Lafaille, 97; Cannella, 98]. Die einzige bekannte Ausnahme bilden immundefiziente RAG-1 knockout Mäuse, bei denen Th2-Zellen eine untypische Art von EAE induzieren, die in ihren histologischen

Merkmale an einen allergischen Prozess erinnert [Lafaille, 94]. Ob sie protektiv wirken, scheint am experimentellen Aufbau zu liegen. Eine EAE, die durch adoptiven Transfer von MBP-spezifischen, enzephalitogenen T-Zellen induziert wurde, bessert sich, wenn man die gleichen T-Zellen durch Gentransduktion IL-4 produzieren lässt und vor Ausbruch der Krankheit zusätzlich transferriert. Die tägliche Gabe von IL-4 vor dem adoptiven Transfer von enzephalitogenen T-Zellen bzw. vor Ausbruch der Krankheit führt zu einer Besserung des Krankheitsbildes, der Induktion von MBP-spezifischen Th2-Zellen, einer verminderten Demyelinisierung und Hemmung der Synthese pro-inflammatorischer Zytokine im ZNS [Racke, 94]. Der adoptive Transfer von Th2-Zellklonen schützte Mäuse vor einer EAE-Induktion durch Proteolipidprotein und war sogar in der Lage, eine EAE zu heilen [Kuchroo, 95]. Eine andere Studie zeigte hingegen, dass bei einer EAE-Induktion durch adoptiven Transfer von MBP-spezifischen Th1-Zellen ein gleichzeitiger Transfer von Th2-Zellen die Krankheit nicht verhindern kann. Dennoch scheinen schwach polarisierte T-Zelllinien, welche sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine produzieren, weniger enzephalitogen zu sein als Th1-Zellen [Khoruts, 95]. Bei einer bereits etablierten EAE wurde während der Remission [Chen, 98] sowie bei pharmakologischer Behandlung mit Copolymer 1 [Aharoni, 97; Neuhaus, 00] und dem Immunmodulator Linomid [Karussis, 99] eine Th2-Verschiebung beobachtet. Es wurde sogar eine Art von Bystander-Suppression von enzephalitogenen Th1-Zellen durch nicht ZNS-spezifische Th2-Zellen beobachtet [Falcone, 97]. Insgesamt lässt das den Schluß zu, dass Th2-Zellen aktiv zur Krankheitsremission beitragen können.

Um Klarheit zur Rolle der Th2-Zellen zu erlangen, erschien mir die Hirnschnittkultur besser geeignet als *in vivo*-Versuche, da man in ihr Interaktionen von Th1- und Th2-Zellen mit ZNS-Gewebe unter Ausschluß von Einflüssen aus der Peripherie modellieren kann, da weder die Blut-Hirn-Schranke die Infiltration des Gewebes durch Th1 oder Th2-Zellen differentiell beeinflussen kann, noch weitere Zellen aus der Peripherie rekrutiert werden können.

Abb. 2 zeigt den Versuchsaufbau für diese Untersuchungen.

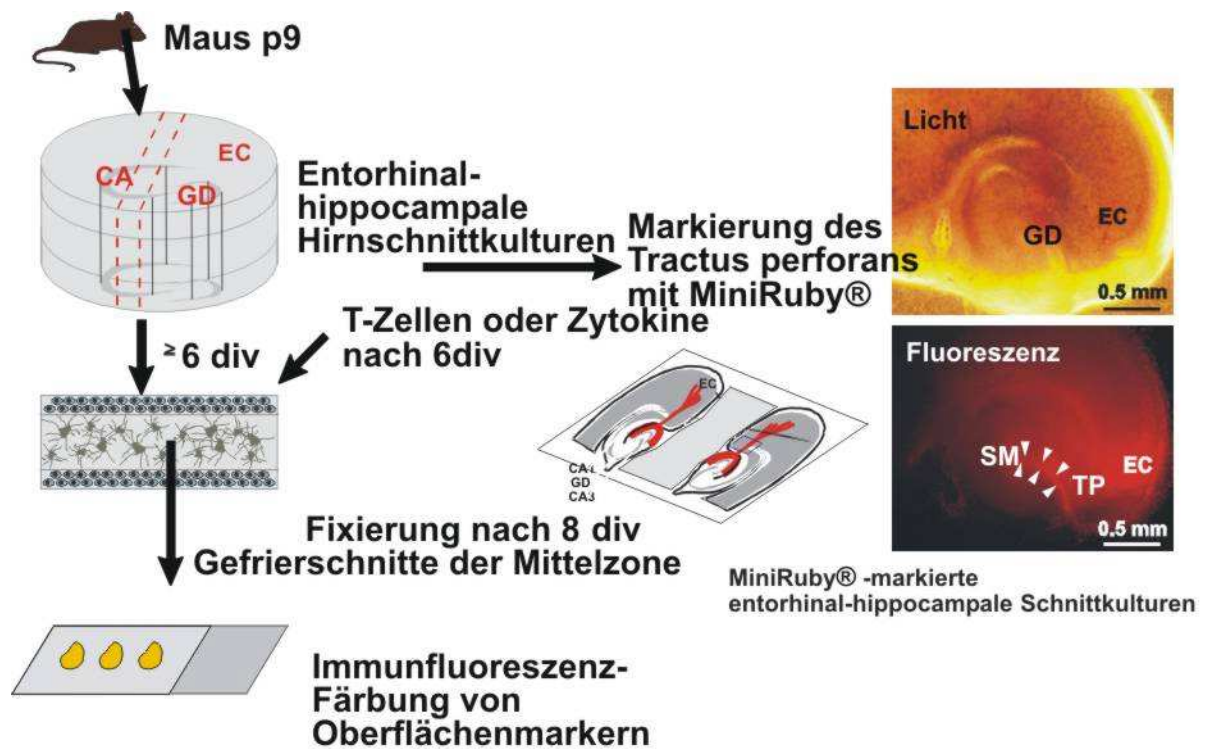


Abb. 2: Experimenteller Ablauf von Untersuchungen in Hirnschnittkulturen

Abkürzungen:

CA	Cornu ammonis
div	days in vitro; Tage in vitro
EC	entorhinaler Cortex
GD	Gyrus dentatus
p9	postnatal Tag 9 (9 Tage alt)
SM	Stratum moleculare
TP	Tractus perforans

5. Wechselwirkungen von T-Helferzellen mit Mikrogliazellen

5.1. Phagozytose von myelinisierten Nervenfasern durch aktivierte Mikrogliazellen - Rolle der Antigenpezifität der T-Zellen

Zunächst wurde die Fähigkeit von aktivierten T-Zellen zur Aktivierung von Mikrogliazellen als Voraussetzung und Merkmal für inflammatorische Prozesse in der Schnittkultur untersucht. Dafür stammten die T-Zellen entweder aus transgenen Mäusen, deren T-Lymphozyten einen TCR für ein MBP-Peptid trugen [Liu, 95] oder aus Wildtypmäusen des gleichen Stammes (B10.PL). Die transgenen CD4⁺-T-Zellen wurden mit MBP-Peptid antigenspezifisch stimuliert. Die Wildtyp-CD4⁺-T-Zellen wurden mit PMA/Ionomycin unspezifisch aktiviert. Sowohl die spezifisch als auch die unspezifisch aktivierten T-Zellen wanderten in die Schnittkultur ein und wurden dort mit Mikrogliazellen colokalisiert gefunden (**Anlage 5**, Fig. 4). Beide T-Zellpopulationen waren in der Lage, Mikrogliazellen zu aktivieren, was sich in der Expression von MHC-II und ICAM-1 auf den Mikrogliazellen äußerte (**Anlage 5**, Fig. 8 und 9). Während diese MHC-II-Expression eine Voraussetzung für die Antigenpräsentation an CD4-T-Zellen darstellt, dient ICAM-1 als costimulatorisches und Adhäsionsmolekül der Kommunikation zwischen T-Zellen und Mikrogliazellen. Als Hinweis auf einen pathogenen Effekt wurde eine verstärkte Phagozytose neuronalen Materials durch Mikrogliazellen (**Anlage 5**, Fig. 7). Interessanterweise aktivierten MBP-spezifische T-Zellen die Mikrogliazellen weitaus stärker als die unspezifisch aktivierten T-Zellen von Wildtypmäusen gefunden (**Anlage 5**, Fig. 10). Gemessen an der Expression von Aktivierungsmarkern und der Sekretion von IFN- γ waren die MBP-spezifischen T-Zellen jedoch deutlich weniger aktiviert als die unspezifischen T-Zellen (**Anlage 5**, Fig. 2 und 3). TNF- α konnte in den T-Zell-Überständen nicht nachgewiesen werden (**Anlage 5**, Fig. 3). Ein Absterben des Gewebes wurde anhand von Propidiumjodidfärbungen der Schnittkulturen ausgeschlossen (**Anlage 5**, Fig. 5). Die Zugabe von rekombinantem IFN- γ bzw. TNF- α hatte eine ähnliche Mikrogliaaktivierung wie die durch T-Zellen induzierte zur Folge (**Anlage 5**, Fig. 8 und 9). IFN- γ war im Gegensatz zu TNF- α jedoch nicht in der Lage, eine Phagozytose axonalen Materials zu induzieren (**Anlage 5**, Fig. 11). Daher beruhte die T-Zell-induzierte Phagozytose vermutlich auf einer Kombination von Effekten. Zum einen aktivierte das von T-Zellen sekretierte IFN- γ die Mikrogliazellen und ermöglichte den zellulären Kontakt mit den T-Zellen über Adhäsionsmoleküle. Zum anderen könnten dann zelluläre Interaktionen zur Sekretion von TNF- α durch Mikrogliazellen geführt haben. Eine solche TNF- α -Sekretion wurde nach Bindung des Moleküls VCAM-1 auf den Mikrogliazellen an VLA-4 auf den T-Zellen beschrieben [Chabot, 97]. In unserem System konnte keine TNF- α -Produktion durch Mikrogliazellen nachgewiesen werden, was an der starken Verdünnung durch das Medium und der Sensitivität des ELISAs liegen könnte. Lokale Effekte sind dennoch nicht auszuschließen.

5.2. Der unterschiedliche Einfluss polarisierter Th1- und Th2-Zell-Linien auf Mikrogliazellen – mögliche Erklärung einer neuroprotektiven Wirkung von Th2-Zellen in demyelinisierenden Erkrankungen

Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde die Aktivierung von Mikrogliazellen durch transgene MBP-spezifische Th1- und Th2-Zellen [Liu, 95] in entorhinal-hippocampalen Schnittkulturen untersucht. Als Marker für aktivierte Mikrogliazellen wurden die Expressionsmuster des regulatorischen Moleküls CD40, des Adhäsions- und costimulatorischen Moleküls ICAM-1 sowie der costimulatorischen Moleküle B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) studiert. B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) sind die wichtigsten costimulatorischen Moleküle auf APCs. Sie liefern nach der TCR—MHC-II-Ligation ein zweites stimulierendes Signal, welches essentiell für die T-Zell-Proliferation ist und ohne das T-Zellen anergisch werden. Das regulatorische Molekül CD40 wurde auf Mikrogliazellen sowohl in Co-Kulturen mit Th1-Zellen als auch in Co-Kulturen mit Th2, jedoch nicht in Kontrollkulturen gefunden (**Anlage 6**, Fig. 5 und 7). ICAM-1 wurde auf Mikrogliazellen in Co-Kulturen mit Th1-Zellen hoch exprimiert, nicht jedoch in Co-Kulturen mit Th2-Zellen und Kontrollkulturen (**Anlage 6**, Fig. 6). Um festzustellen, ob Th2-Zellen nur passiv Mikrogliazellen *nicht* aktivierten oder den Aktivierungszustand der Mikrogliazellen aktiv beeinflussten, wurden den Schnittkulturen zunächst für 24h Th1-Zellen und darauffolgend Th2-Zellen für weitere 24h zugesetzt. In einem umgekehrten Protokoll wurden nach 24h Co-Kultur mit Th2-Zellen Th1-Zellen zugesetzt. In beiden Fällen wurde die ICAM-1 Expression durch Th2-Zellen unterdrückt. Der Ligand für ICAM-1 ist LFA-1. Willenborg et al. [96] zeigten, dass Ratten durch eine Behandlung mit anti-LFA-1-Antikörpern gegen EAE geschützt werden. Es ist also denkbar, dass Th2-Zellen, indem sie die ICAM-1-Expression auf Mikrogliazellen unterdrücken, die Costimulation über ICAM-1/LFA-1 unterbinden und auf diese Weise immunmodulatorisch wirken. Grund für diese Annahme ist, dass ICAM-1 in der Lage ist, unabhängig von CD28 costimulatorisch zu wirken und den Haupt-Costimulationsweg zu bilden, sollte der B7-CD28-Weg ausfallen [Gaglia, 00]. ICAM-1 ist jedoch auch bei Vorhandensein des B7-CD28-Signalwegs für die T-Zell-Proliferation wichtig [Salomon, 98]. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Rollen dieser Signalwege in der T-Helferzell-Differenzierung beschrieben. Während eine Blockade des B7/CD28-Signalwegs zu einer Verminderung der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 führte, hatte eine Blockade des ICAM-1/LFA-1-Signalweges eine signifikante Zunahme der Th2-Zytokine zur Folge [Salomon, 98]. Im Lichte dieser Zusammenhänge könnte die von uns beobachtete Unterdrückung der ICAM-1-Expression zu einer Verstärkung der anti-inflammatorischen Th2-Immunantwort führen.

Um die Regulation von B7-1 und B7-2 durch T-Helferzellen zu untersuchen, wurden den Schnittkulturen zusätzlich zu den MBP-spezifischen Th1- und Th2-Zellen [Liu, 95] transgene Ovalbumin-spezifische Th1- und Th2-Zellen [Murphy, 90] zugesetzt. In

Kontrollkulturen exprimierten Mikrogliazellen im Ruhezustand B7-2, jedoch nicht B7-1 (**Anlage 7**, Fig. 1 und 2). Während Th1-cokultivierte Mikrogliazellen B7-1, jedoch nicht B7-2 exprimierten, exprimierten die Mikrogliazellen in Th2-Co-Kulturen wie in Kontrollkulturen kein B7-1, B7-2 dafür aber unvermindert stark. Um zu testen, ob die Th2-Zellen die B7-2 Expression aktiv beeinflussten oder sich nur passiv verhielten, indem sie die ohnehin auf Mikrogliazellen vorhandene Expression nicht veränderten, wurden zu den Th1-Co-Kulturen einen Tag später Th2-Zellen hinzugegeben. In diesen Versuchen waren die Th2-Zellen nicht in der Lage, die B7-2 Expression wieder zu induzieren. Die Hochregulation von B7-1 bei gleichzeitiger Herunterregulation von B7-2 durch Th1-Zellen erfolgte sowohl unabhängig von der Antigenspezifität der T-Zellen als auch unabhängig davon, ob die Th1-Zellen direkten Kontakt zu den Schnittkulturen hatten, sofern die Th1-Zellen durch Anwesenheit von Antigen (und vermutlich einiger weniger kontaminierender APCs aus der vorhergegangenen T-Zellkultur) ausreichend aktiviert waren (**Anlage 7**, Fig. 1 und 2). Das Wirken eines durch Th1-Zellen produzierten löslichen Faktors konnte so sehr wahrscheinlich gemacht werden. Als Möglichkeiten für B7-1 induzierende Agenzien werden in der Literatur TNF- α , GM-CSF, IL-1 β und IFN- γ kontrovers diskutiert [Aloisi, 97; Wei, 99]. Im System der entorhinal-hippocampalen Schnittkultur konnte ich die B7-1 induzierende Wirkung von IFN- γ jedoch nicht von TNF- α nachweisen (siehe 4.3.). Da T-Zellen costimulatorische Signale von APCs gleichermaßen über B7-1 wie B7-2 erhalten, ist die beobachtete differentielle Regulierung allein gesehen kein Indiz für eine neuroprotektive Wirkung von Th2-Zellen. Geht man jedoch davon aus, dass Th2-Zellen die B7-Expression nicht verändern, und in frisch perfundiertem Gewebe eine wesentlich geringere B7-2 und keine B7-1 Expression nachzuweisen sind (**Anlage 7**, Fig. 2), so liegt die Vermutung nahe, dass Th2-Zellen *in vivo* keine B7-Expression auf Mikrogliazellen induzieren. Somit würden sie also passiv dazu beitragen, dass Mikrogliazellen nicht zu immunkompetenten APCs werden. Zusammen mit ihrer aktiven Rolle bei der Suppression der ICAM-1-Expression zeichnet sich ein Bild ab, in dem Th2-Zellen im ZNS immunmodulatorisch wirken können, indem sie eine Aktivierung von Mikrogliazellen unterdrücken bzw. nicht fördern.

Andererseits gibt es Hinweise, dass im Zusammenhang mit neuroimmunologischen Prozessen die Costimulation über B7-1 anders als die Costimulation über B7-2 wirkt. Es gibt Arbeiten, die zeigen, dass eine Blockade der B7-1-Costimulation eine EAE verhindert bzw. abmildert, während eine Blockade der B7-2-Costimulation sich gegenteilig auswirkt. Andere Gruppen publizierten jedoch dem widersprechende Befunde. Tab. 2 zeigt eine Übersicht über diese Arbeiten.

Tab. 2: Einfluss der Costimulation über B7-1 und B7-2 auf den Verlauf der induzierten EAE in Mausmodellen verschiedener Stämme und unterschiedlicher Protokolle; bestimmt durch Antikörperblockade oder Gen-Knock out

Stamm (MHC-II Typ)	EAE- Induktion durch	Knock out von	Antikörperblockade		Wirkung auf EAE	Ref.
			Von? (Klon)	Ab wann?		
NOD (I-A ^{g7})	PLP- Peptid	B7-1			Verzögerter Krankheitsbeginn	1
		B7-2			Leichterere Krankheitsverlauf; n.s. verminderte Inzidenz	
			B7-1 (mAb) (16-10A1)	2 Tage vor EAE- Induktion	Unverändert	
			B7-2 (mAb) (GL-1)		n.s. verminderte Inzidenz	
			B7-1+ B7-2 (mAbs)		Verzögerter Krankheitsbeginn; n.s. verminderte Inzidenz	
C57Bl/6 I-A ^b	MOG- Peptid	B7-1			Unverändert	2
		B7-2			Unverändert	
		B7-1/B7-2			keine EAE!	
	Adoptiver Transfer von MOG- spezif. T- Zellen	B7-1/B7-2			Verzögerter Krankheitsbeginn; n.s. verminderte Inzidenz Leichterere Krankheitsverlauf	
SJL (I-A ^s)	PLP- Peptid		B7-1 (mAb) (1G10)	Ab Tag der EAE- Induktion i.p. jeden 2.Tag	Signifikant verminderte Inzidenz	3
			B7-2 (mAb) (2D10) (GL-1)		Leichterere Krankheitsverlauf bei den erkrankten Tieren Schwerere Krankheitsverlauf	
SJL	Adoptiver Transfer von MBP- spezif. T- Zellen		B7-1 (mAb) (16-10A1)	Während der <i>in vitro</i> - Aktivierung von T Zellen von MBP/CFA- immuni- sierten Mäusen	Unverändert	4
			B7-2 (mAb) (GL-1)		Etwas leichterere Krankheitsverlauf	
			B7-1+B7-2 (mAbs)		Sehr viel leichterere Krankheitsverlauf	
(PLJ/SJL) F1 (I-A ^u x I-A ^s)	MBP/CFA (kein PTX!)		B7-1 (mAb) (16-10A1)	einmalig i.p. am Tag 2 nach EAE- Induktion	n.s. verminderte Inzidenz; Leichterere Krankheitsverlauf bei den erkrankten Tieren	
			B7-2 (mAb) (GL-1)		n.s. höhere Inzidenz; Schwerere Krankheitsverlauf	

SJL	PLP-Peptid		B7-1 (Fab) (1G10) (16-10A1)	i.p. jeden 2.Tag ab Tag der	Geringere Schubrate (Rückfallrate); Kein Epitope spreading	5
			B7-2 (mAb) (GL-1)	Erholung von initialer	Früherer Rückfall	
SJL	PLP-Peptid		B7-1 (mAb) (1G10) (16-10A1)	para- lytischer Episode	Früherer Rückfall; Höhere Schubrate; Multiple Schübe; Epitope spreading	6

Referenzen:

- 1 Girvin et al. [00]
- 2 Chang et al. [99]
- 3 Kuchroo et al. [95]
- 4 Racke et al. [95]
- 5 Miller et al. [95]
- 6 Vanderlugt et al. [97]

Abkürzungen:

CFA "Complete Freund's adjuvans"; komplettes Freund'sches Adjuvans
 Fab Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers
 i.p. intraperitoneal
 mAb "monoclonal antibody"; hier: kompletter monoklonaler Antikörper
 MBP "Myelin basic protein"; basisches Myelinprotein
 MOG "Myelin oligodendrocyte glycoprotein"; Myelin-Oligodendrozytenglykoprotein
 n.s. nicht signifikant
 PLP Proteolipidprotein
 PTX Pertussis-Toxin
 Ref. Referenz

Die zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse sind jedoch unter schwer vergleichbaren Versuchsbedingungen entstanden, da nicht nur verschiedene Mausstämme mit unterschiedlichem MHC-II sondern auch verschiedene EAE-Modelle (Antigene/EAE-Induktionsprotokolle) benutzt wurden. Auch die Art der Blockade war divers. Auffällig ist z.B. dass dieselbe Gruppe im gleichen Tiermodell und bei gleichem Applikationsprotokoll bei Einsatz von Fab-Fragmenten gegen B7-1 eine Verbesserung im Verlauf der schubförmigen EAE beobachtet [Miller, 95], während sie bei Einsatz von kompletten Antikörpern eine Verschlimmerung feststellt [Vanderlugt, 97]. Im Allgemeinen werden Fab-Fragmente bevorzugt, da komplette Antikörper Moleküle kreuzvernetzen können und so statt zur beabsichtigten Blockierung eines Moleküls zu dessen Aktivierung führen. Ob dies in den oben erwähnten Versuchen der Fall war, bleibt unklar. Dagegen spricht, dass der Einsatz kompletter Antikörper in zwei anderen oben erwähnten Modellen [Kuchroo, 95; Racke, 95] zu ähnlichen EAE-mildernden Effekten führt wie die Fab-Fragmente in obigem Modell. Möglicherweise spielen

genetische Faktoren oder die spezifischen Eigenheiten des Krankheitsmodells (Immunisierung versus adoptiver Transfer; Zeitpunkt und Dosis der Antikörpergabe) hierbei eine Rolle. Vielleicht ist auch die Anwendung von Knock-out-Tieren [Girvin, 00; Chang, 99] nicht wirklich aussagefähig, weil den Tieren schon seit ihrer Embryonalentwicklung eines oder beide costimulatorische Moleküle nicht zur Verfügung standen, so dass sich sehr wahrscheinlich kompensatorische Mechanismen, wie die Nutzung anderer Signalwege, entwickelt haben. Kuchroo et al. [95] fanden eine Th2-Verschiebung der Immunantwort bei Blockade von B7-1 und begründeten damit die beobachtete Abschwächung der EAE. Dieser Befund wird gestützt durch Befunde in anderen Krankheitsmodellen wie der murinen Lyme-Borreliose [Shanafelt, 98] und einem Asthmodell [Tsuyuki, 97], wo eine Blockade von B7-1 eine Th2-Antwort, eine Blockade von B7-2 hingegen eine Th1-Antwort förderte.

Wir fanden Hinweise, dass die Expression von B7-2 in Abwesenheit einer B7-1 Expression durch Mikrogliazellen im ZNS „harmlos“ ist. So kam es nach einer operativen Läsion des entorhinalen Cortex in Wistar-Ratten zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen. Diese wurde als Phagozytose von vormarkierten Fasern des Tractus perforans und MHC-II Expression durch Mikrogliazellen sichtbar. Die Phagozytose wird von einer Expression von B7-2, jedoch nicht B7-1 auf Mikrogliazellen und von einer Infiltration des Hirngewebes durch T-Zellen begleitet **E:**[Bechmann, 01], führte jedoch nicht zu einer Autoimmunreaktion, obwohl dafür alle Voraussetzungen erfüllt schienen: T-Zellen, Antigenpräsentation über MHC-II und das Vorhandensein des costimulatorischen Signals. Das Ausbleiben einer Reaktion könnte ein Hinweis auf eine neuroprotektive Rolle von B7-2 sein **E:**[Bechmann, 01]. Möglicherweise erreichen jedoch auch nur zu wenig antigenspezifische T-Zellen das ZNS, so dass die Schwelle zu einer entzündlichen Reaktion nicht überschritten wurde.

5.3. Wirkung von pro-inflammatorischen Zytokinen auf den Aktivierungszustand von Mikrogliazellen und den Gewebeerhalt im ZNS

Zum Studium von Effekten durch Zytokine und Mediatoren, die durch aktivierte T-Lymphozyten bzw. andere Zellen (z.B. Mikrogliazellen) produziert werden, nachdem diese mit aktivierten T-Lymphozyten interagiert haben, wurden im folgenden Hirnschnittkulturen dem Einfluss von IFN- γ , TNF- α , und IL-1 β ausgesetzt. Die im folgenden dargestellten Ergebnisse zu diesen 3 Zytokinen wurden bisher nur zum Teil veröffentlicht (**Anlage 5**).

IFN- γ : IFN- γ wird durch Th1-Zellen, CD8+ T-Zellen und NK-Zellen produziert. In den Versuchen wurden dem Kulturmedium der Hirnschnittkulturen am Tag 6 2ng/ml (ca. 20U/ml) bzw. 10ng/ml (ca. 100U/ml) rekombinantes IFN- γ zugegeben. Am Tag 8 wurden die Kulturen fixiert und immunhistochemisch analysiert. IFN- γ war in beiden

getesteten Konzentrationen in der Lage, Mikrogliazellen zu aktivieren, indem es die Expression von MHC-II und des costimulatorischen Moleküls ICAM-1 auf den Zellen induzierte (**Anlage 5**, Fig. 8 und 9). Ruhende Mikroglia wurden zu immunkompetenten APCs. Eine toxische Wirkung von IFN- γ konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Propidiumjodidfärbung der unfixierten Schnittkultur am Tag 8 zeigte keine signifikant erhöhte Gewebsschädigung gegenüber den Kontrollkulturen (Abb. 7). Ebenso war keine Phagozytose MiniRuby®-markierten axonalen Materials durch Mikrogliazellen zu beobachten, was den Schluß nahelegt, dass der Tractus perforans nicht geschädigt wurde (Abb. 3). Eine mikrogliale Expression von VCAM-1 konnte nicht detektiert werden. Dieser Befund deckt sich mit einigen Literaturdaten [Aloisi, 00], widerspricht jedoch anderen [Chabot, 97]. Während Mikrogliazellen in den unbehandelten Kontrollkulturen B7-2 exprimierten, exprimierten sie in den IFN- γ -behandelten Schnittkulturen das costimulatorische Molekül B7-1 (Abb. 4 und 5). Wie unter 4.2. ausführlich diskutiert, zeigten sich im EAE-Modell Hinweise auf eine protektive Wirkung, wenn die Costimulation über B7-2 erfolgt, bzw. die Costimulation über B7-1 unterdrückt wird [Miller, 95; Takahashi, 00]. Trotz der Kontroverse möchte ich auf Grund unserer eigenen Ergebnisse die Hypothese aufstellen, dass ruhende Mikrogliazellen aufgrund ihrer B7-2-Expression zu intrinsischen anti-inflammatorischen Eigenschaften von Hirngewebe beitragen und dass diese Eigenschaft von pro-inflammatorischen Zytokinen gestört wird.

TNF- α : Parallel zu den IFN- γ -Untersuchungen wurden Versuche mit TNF- α durchgeführt, einem Zytokin, welches sowohl von Th1-Zellen als auch aktivierten Mikrogliazellen produziert werden kann. 0,1ng/ml (ca. 1U/ml) bzw. 0,5ng/ml (ca. 5U/ml) TNF- α wurden zum Kulturmedium der Schnittkulturen zugegeben, die bis dahin 6 Tage in Kultur waren und am Tag 0 mit MiniRuby® markiert worden waren. Am Tag 8 wurden die Kulturen fixiert und für die Immunhistochemie bzw. Elektronenmikroskopie vorbereitet. Es wurde eine massive Phagozytose markierter Fasern des Tractus perforans durch Mikrogliazellen gefunden (Abb. 3 und **Anlage 5**, Fig. 11), ein Befund, der elektronenmikroskopisch bestätigt werden konnte. Interessanterweise zeigten die elektronenmikroskopischen Bilder, dass Mikrogliazellen in Schnittkulturen mit TNF- α myelinisierte Axone phagozytiert hatten, so dass anzunehmen ist, dass der axonalen Schädigung keine Demyelinisierung vorausging (Abb. 6). Parallel dazu war mittels einer Propidiumjodidfärbung eine toxische Wirkung von TNF- α auf das Gewebe, vor allem auf Neurone zu beobachten (Abb. 7), so dass davon auszugehen ist, dass die zum Tractus perforans gehörigen Neurone bereits vor der Phagozytose geschädigt waren. Die Mikrogliazellen in den Schnittkulturen exprimierten MHC-II und die costimulatorischen Moleküle ICAM-1 und B7-2, so dass sie potentiell als APCs fungieren könnten (**Anlage 5**, Fig. 8 und 9 und Abb. 5 hier). Eine VCAM-1 Expression konnte nicht detektiert werden.

IL-1 β : IL-1 β ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches von Makrophagen und aktivierten Mikrogliazellen, jedoch auch von Astrozyten produziert werden kann. In MS [de Jong, 02; Martin, 95] aber auch in RA trägt es zur Gewebsdestruktion bei [Dayer, 02; Abramson, 02]. In den Schnittkulturen sollte sein Einfluss auf den Aktivierungszustand der Mikrogliazellen und den Gewebeerhalt untersucht werden. Zum Kulturmedium der Hirnschnittkulturen wurden am Tag 6 ihrer Kultivierung 1ng/ml (ca. 500U/ml) bzw. 10ng/ml (ca. 5000U/ml) IL-1 β zugegeben. Die immunhistochemische Analyse nach Fixierung der Kulturen am Tag 8 ergab, dass die Mikrogliazellen in diesen Kulturen zwar B7-2 (Abb. 5), jedoch weder MHC-II, ICAM-1, VCAM-1 noch B7-1 (Abb. 4) exprimierten. Das heißt, IL-1 β ist allein nicht in der Lage, ruhende Mikrogliazellen in vollwertige APCs umzuwandeln. Propidiumjodidfärbungen zeigten eine leichte Schädigung neuronalen Gewebes sowohl durch 1ng/ml als auch 10ng/ml IL-1 β . Diese spiegelte sich in der Phagozytose markierten axonalen Materials wider (Abb. 3). Daraus lässt sich schließen, dass auch Mikrogliazellen, die nicht massiv aktiviert sind, ihren Aufgaben als Phagozyten, d.h. der Beseitigung von Zelltrümmern nachgehen können. Unsere Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen in Mikroglia-kulturen überein, in denen Mikrogliazellen Latex-Beads phagozytierten, ohne im folgenden eine Expression von immunrelevanten Molekülen aufzuweisen **E:**[Beyer, 00]. Während in diesen Einzelzellkulturen jedoch eine Expression von MHC-II nach Phagozytose neuronaler Membranen zu beobachten war, traf dies auf unsere Hirnschnittkulturen nicht zu. Ursache für diesen Unterschied könnte der Zeitpunkt der Beobachtung (72h in Einzelzellkulturen versus 48h in Hirnschnittkulturen), die latente Aktivierung von Mikrogliazellen in Einzelzellkulturen oder eine Unterdrückung der Mikrogliaaktivierung durch Astrozyten in den Hirnschnittkulturen sein.

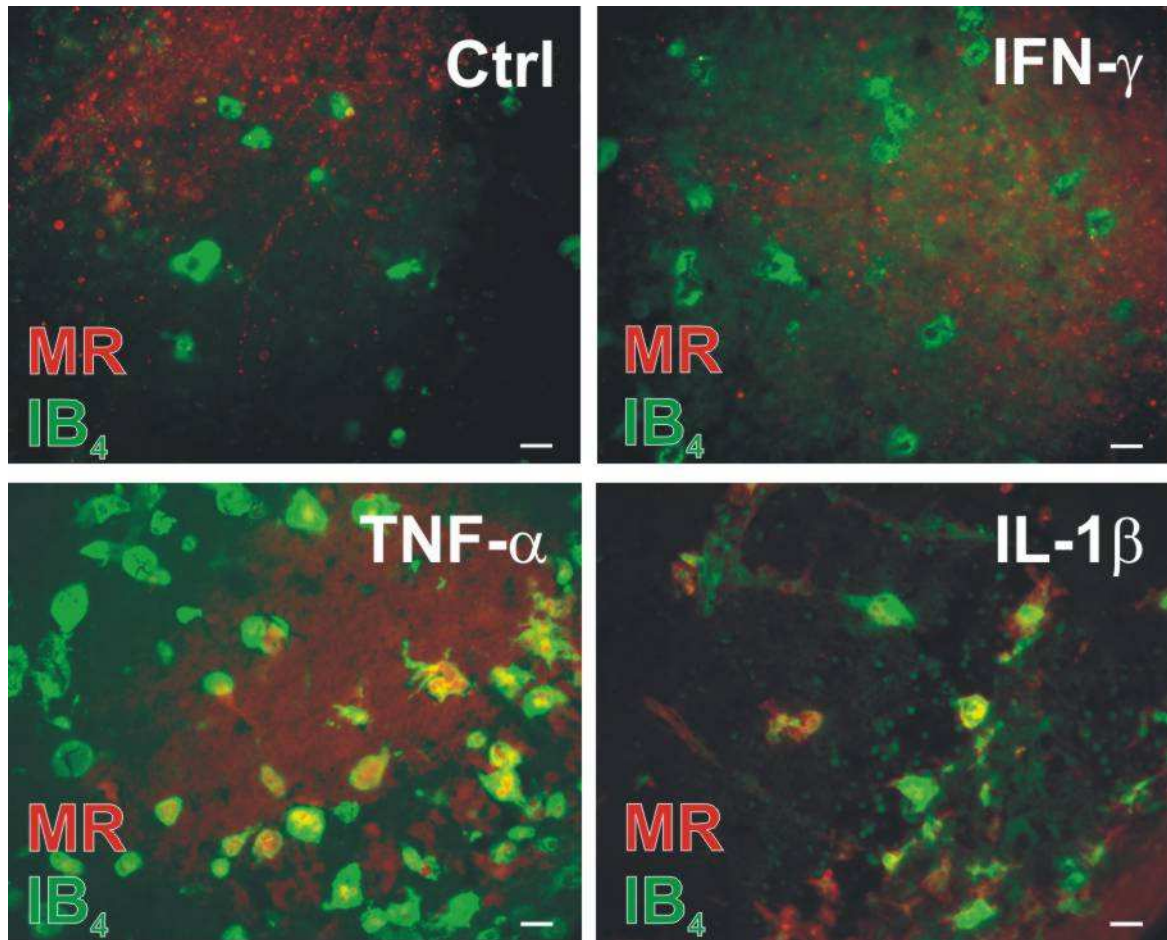


Abb. 3: Phagozytose MiniRuby (MR)-markierten axonalen Materials (rot) durch Mikrogliazellen (grün) unter Einfluss von TNF- α und IL-1 β jedoch nicht unter dem Einfluss von IFN- γ . Die Hirnschnittkulturen wurden nach 6 Tagen in Kultur für 48h mit 10ng/ml IFN- γ , 0,5ng/ml TNF- α bzw. 10ng/ml IL-1 β kultiviert. (Größenmarker=10 μ m)

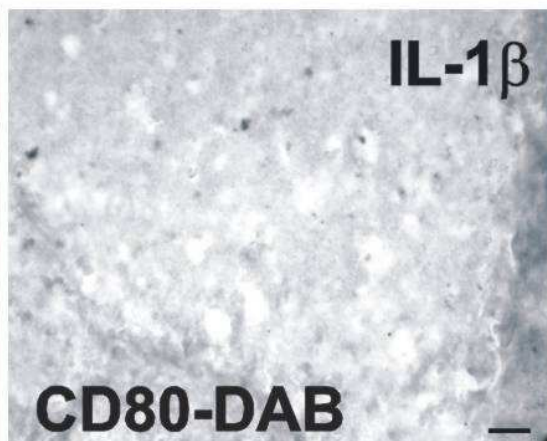
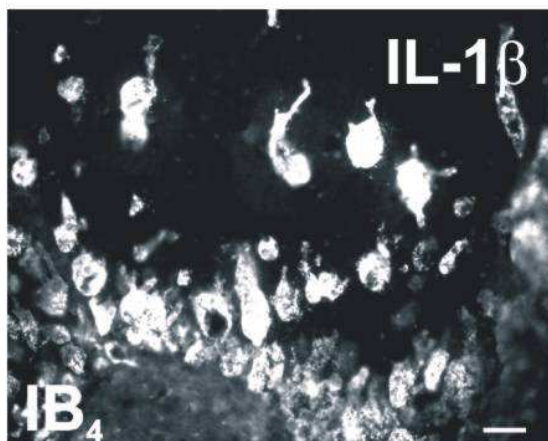
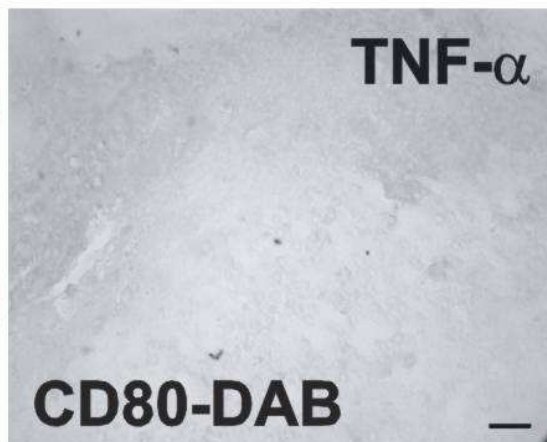
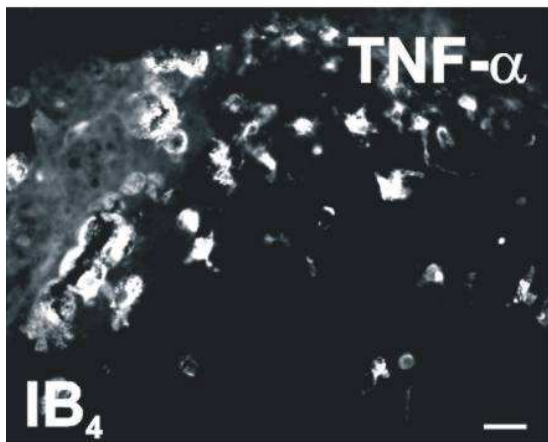
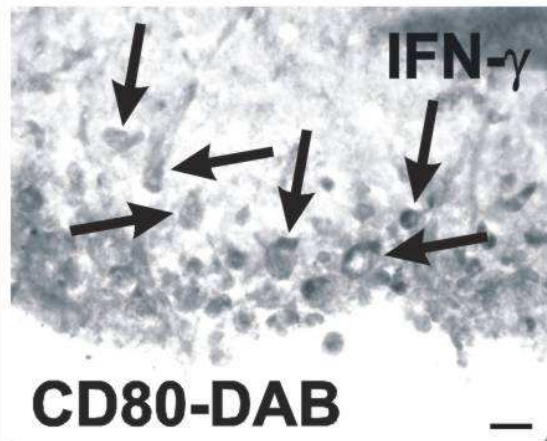
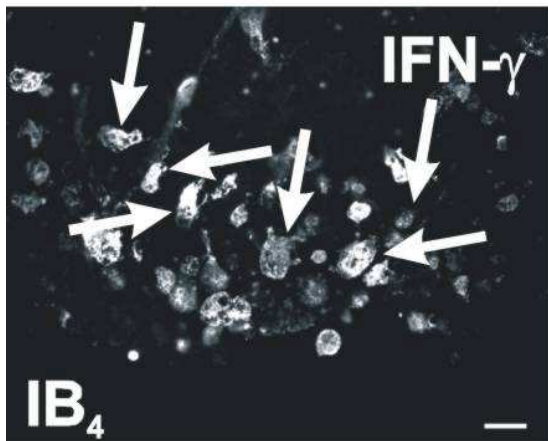
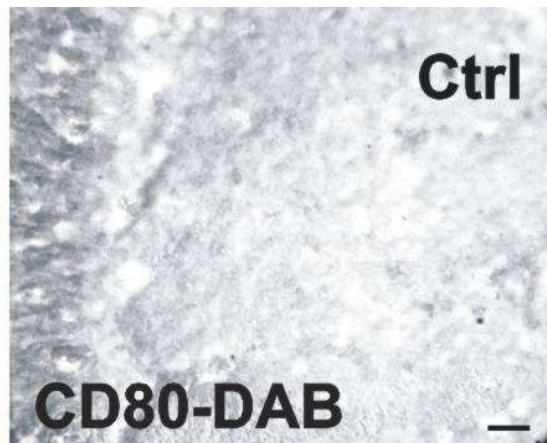
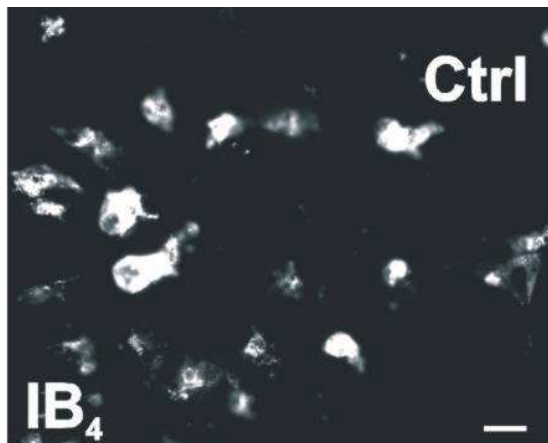


Abb. 4: Expression von B7-1 auf Mikrogliazellen unter dem Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine. Die Hirnschnittkulturen wurden nach 6 Tagen *in vitro* für 48h mit 10ng/ml IFN- γ , 0,5ng/ml TNF- α bzw. 10ng/ml IL-1 β kultiviert. (Größenmarker=10 μ m)

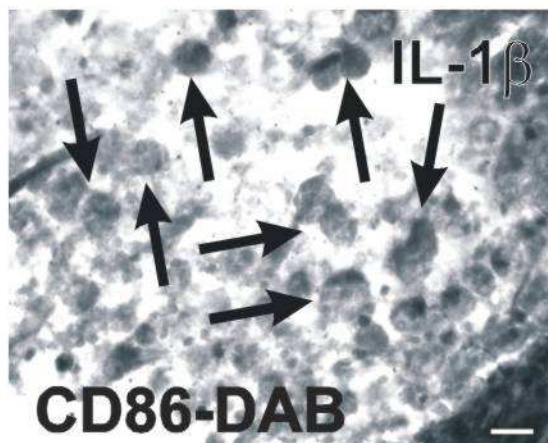
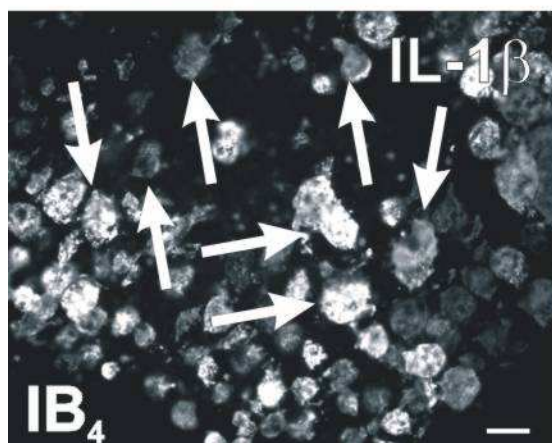
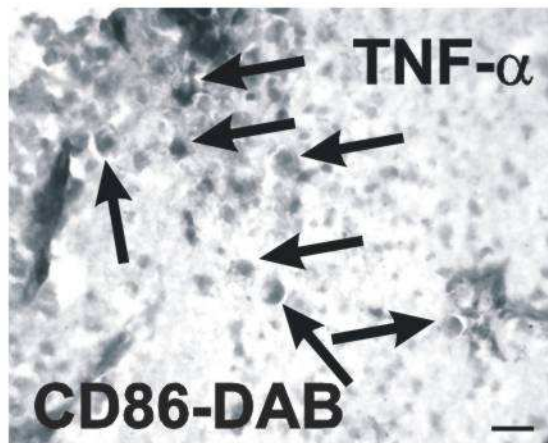
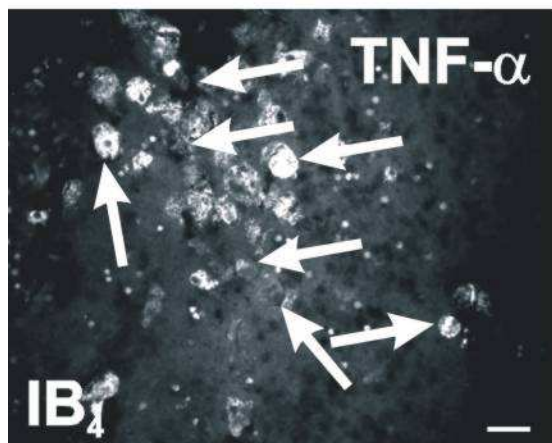
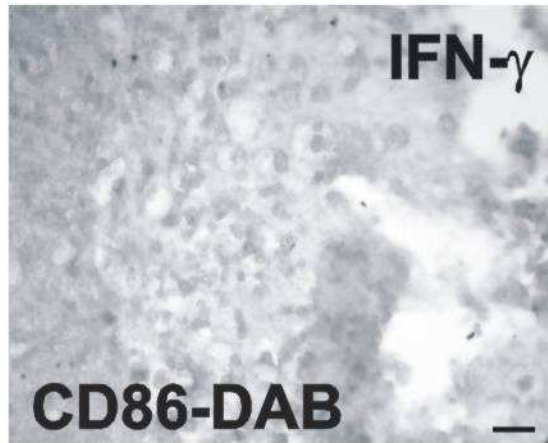
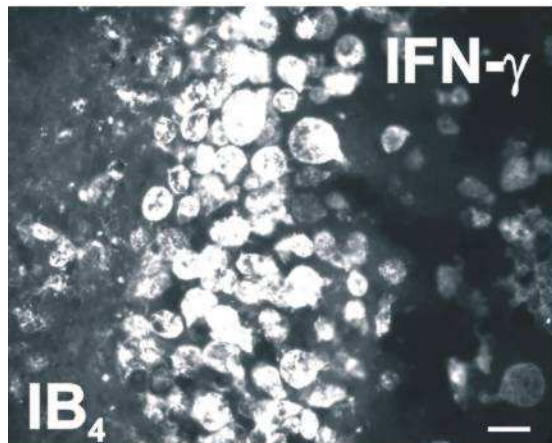
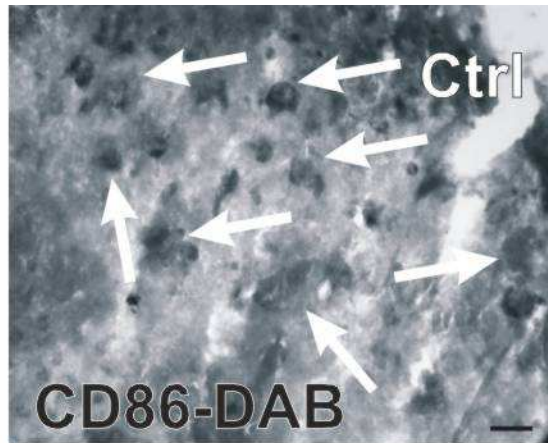
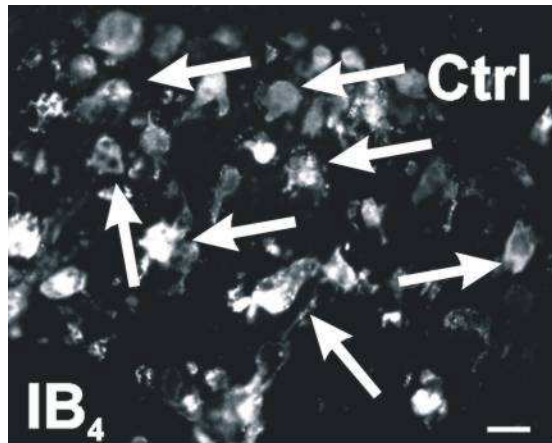


Abb. 5: Expression von B7-2 auf Mikrogliazellen unter dem Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine. Die Hirnschnittkulturen wurden nach 6 Tagen *in vitro* für 48h mit 10ng/ml IFN- γ , 0,5ng/ml TNF- α bzw. 10ng/ml IL-1 β kultiviert. (Größenmarker=10 μ m)

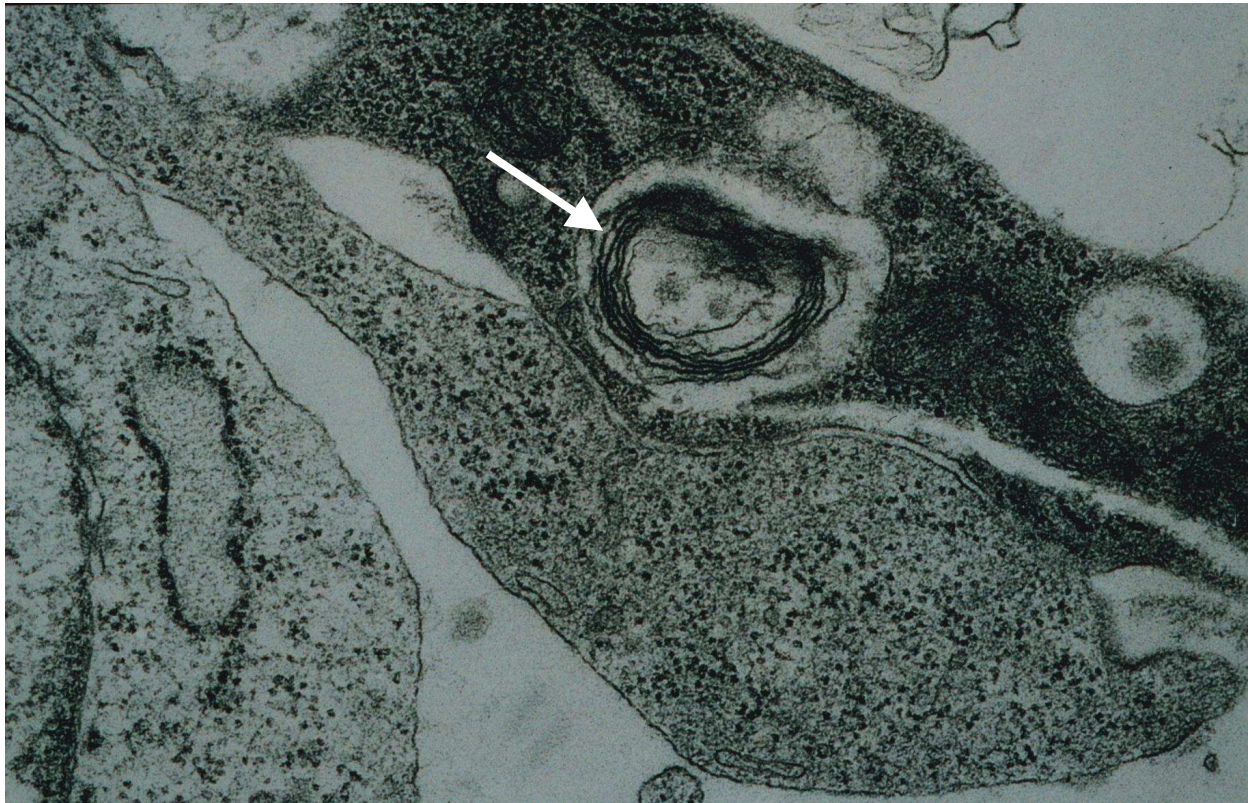


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Phagozytose eines myelinisierten Axons (Pfeil) durch eine Mikrogliazelle. Die Hirnschnittkultur wurde nach 6 Tagen *in vitro* für 48h mit 0,5ng/ml TNF- α kultiviert.

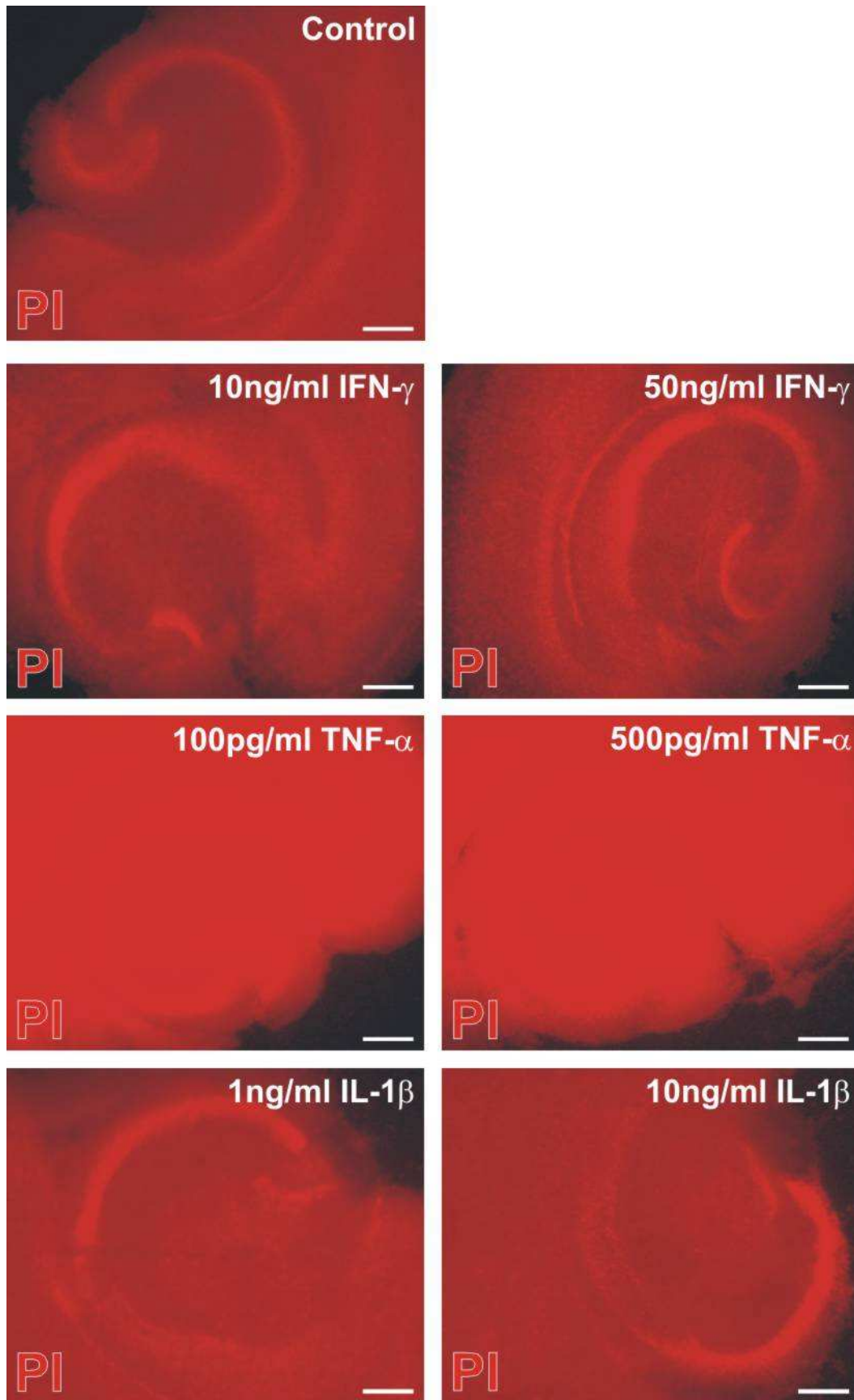


Abb. 7: Propidiumjodidfärbung von Hirnschnittkulturen, die nach 6 Tagen *in vitro* für 48h mit pro-inflammatorischen Zytokinen kultiviert wurden. Man beachte, dass es sich um eine Aufnahme der gesamten, 350 μ m dicken Schnittkultur handelt. Die

Hintergrundfärbung (siehe Kontrolle) entsteht durch abgestorbenes Gewebe an den Schnittflächen. (Größenmarker=0,5mm)

6. Wechselwirkung von T-Helferzellen mit Astrozyten

6.1. Induktion von Apoptose in Th-Zellen durch FasL-exprimierende Astrozyten

In der Plazenta, die wie das ZNS als immunprivilegiertes Gewebe gilt, wurde eine FasL-Expression auf Trophoblastenzellen gefunden, die zur Apoptose von eindringenden T-Zellen, führen [Aschkenazi, 02; Mor, 98; Guller, 99; Kauma, 99]. Auch andere immunprivilegierte Gewebe wie die vordere Augenkammer und die Hoden werden über diesen Mechanismus geschützt [Griffith, 95; Ferguson, 02]. Ähnliches konnte im ZNS beobachtet werden. Astrozyten exprimieren FasL konstitutiv und regulieren es im geschädigten Hirn hoch [Choi, 99]; **E:**[Bechmann, 00]. Damit sind sie in der Lage, Fas-tragende aktivierte T-Zellen zu töten, was einen direkten Mechanismus darstellt, das Immunprivileg des Hirns durchzusetzen (**Anlage 8**, Fig. 1). Blockiert man CD95L durch einen Antikörper, ist eine signifikant geringere T-Zell-Apoptose zu beobachten (**Anlage 8**, Fig. 3). Auch bei der Co-Kultivierung von T-Zellen mit CD95L-defizienten Astrozyten aus *gld*-Mäusen (CD95L^{-/-}) wird eine weitaus geringere Apoptose als mit Astrozyten aus Wildtypmäusen beobachtet (**Anlage 8**, Fig. 1 und 3). Der hier beschriebene Mechanismus tritt auch *in vivo* auf. Das zeigen Arbeiten im EAE-Modell, wo CD95L-exprimierende Astrozyten neben apoptotischen T-Zellen gefunden wurden [Kohji, 98; Kohji, 00]. Wie unsere Untersuchungen zeigen (**Anlage 8**, Fig. 1 und 3), kann man allerdings nicht davon ausgehen, dass alle ins ZNS eindringenden T-Zellen durch Apoptose zugrundegehen. Die Astrozyten-induzierte T-Zell-Apoptose kann daher ein wichtiger, jedoch nicht der ausschließlich hinreichende Schutzmechanismus des ZNS gegen eine T-Zell-Infiltration sein.

6.2. Suppression von Th-Zellen durch Astrozyten-induzierte Hochregulation von CTLA-4

Wie in 5.1. beschrieben, entgehen relativ viele T-Zellen der Astrozyten-induzierten Apoptose. Deshalb benötigt das ZNS weitere Mechanismen, um T-Zell-vermittelte Entzündungen zu unterdrücken. Für mich ergab sich daraus die Frage, ob Astrozyten auch direkt regulierend in die T-Zellaktivierung eingreifen können.

Eine Astrozyten-induzierte Verminderung der T-Zell-Proliferation wurde bereits beschrieben [Sun, 97; Xiao, 98]. Die Autoren führten diese Beobachtung auf eine TCR-Herunterregulierung sowie eine Unterdrückung der Expression von ICAM-1 und MHC-II auf den APCs zurück. Diese Erklärung erschien mir nicht ausreichend, zumal die T-Zellaktivierung von einer TCR-Herunterregulierung begleitet wird. Als Kandidatenmolekül für eine direkte Beeinflussung der T-Zell-Proliferation erschien mir CTLA-4 das vielversprechendste zu sein.

Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktionen von T-Zellen werden durch Signale an der „immunologischen Synapse“ zwischen T-Zellen und APCs über die MHC-II-T-Zellrezeptor-Interaktion und costimulatorische Moleküle präzise reguliert [Creusot, 02]. Die wichtigsten costimulatorischen Moleküle sind die Moleküle B7-1 und B7-2 auf Seiten der APCs sowie CD28 und CTLA-4 auf Seiten der T-Zellen. Sowohl CD28 als auch CTLA-4 können an B7-1 und B7-2 binden, jedoch bindet CTLA-4 mit einer 10-100fach höheren Affinität an B7 als CD28. Während das CD28-Signal die T-Zelle aktiviert, vermittelt CTLA-4 ein Signal, was zum Abschalten der Proliferation führt und damit T-Zellantworten abschwächt bzw. beendet. Die Regulation erfolgt dadurch, dass CD28 konstitutiv, CTLA-4 jedoch nur von aktivierten T-Zellen exprimiert wird [Chambers, 96; Karandikar, 96; Greenwald, 01; Greenwald, 02]. Dadurch wird eine Immunantwort zwar möglich, bleibt zugleich aber begrenzt. Die Bedeutung dieses Mechanismus zeigt sich in CTLA-4-defizienten Mäusen, die im Alter von etwa 4 Wochen an einer massiven lymphoproliferativen Erkrankung sterben [Tivol, 95; Waterhouse, 95]. Die Hochregulation von CTLA-4 erfolgt durch eine Signalkaskade, die von der MHC-II-T-Zellrezeptor-Interaktion ausgelöst wird [Perkins, 96]. Weitere Mechanismen der Hochregulation von CTLA-4 sind in der Literatur nicht beschrieben.

Wir konnten nachweisen, dass Astrozyten die Expression von CTLA-4 auf T-Zellen hochregulieren (**Anlage 9**). Diese Astrozyten-induzierte Expression von CTLA-4 auf T-Zellen hat eine Unterdrückung der T-Zellproliferation (**Anlage 9**, Fig. 1 und 5), aber auch der Zytokinproduktion (**Anlage 9**, Fig. 2), also von Effektorfunktionen der T-Zellen zur Folge. Auch TGF- β scheint an den Effekten beteiligt zu sein, wie mittels Antikörperblockade festgestellt werden konnte. Darüber hinaus wurde eine Suppression der T-Zellaktivierung beobachtet (**Anlage 9**, Fig. 3). Die von Sun et al. [97] beobachtete TCR-Herunterregulierung konnte von uns nicht bestätigt werden, da der TCR nach Aktivierung der T-Zellen in Abwesenheit von Astrozyten sogar noch stärker herunterreguliert wurde. Die Induktion der CTLA-4-Expression in T-Zellen durch Astrozyten erfolgt Zell-Zell-Kontakt-unabhängig, jedoch nur, wenn die T-Zellen zuvor oder gleichzeitig durch antigenspezifische T-Zellrezeptor-MHC-II-Interaktion aktiviert werden (**Anlage 9**, Fig. 4). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Astrozyten und APCs geht das Expressionsniveau jedoch über das bei alleiniger Anwesenheit von APCs hinaus (**Anlage 9**, Fig. 4). Die Induktion einer CTLA-4-Expression in T-Zellen wurde auch erreicht, wenn aktivierte T-Zellen mit Astrozyten-konditioniertem Medium kultiviert wurden, was auf die Existenz eines löslichen Faktors hinweist. Dieses von uns postulierte Molekül könnte zur Eindämmung einer T-Zell-induzierten Inflammation beitragen und ist daher von großem Interesse für evtl. klinische oder pharmakologische Anwendungen nicht nur bei neuroinflammatorischen Erkrankungen, sondern auch bei anderen T-Zell-vermittelten entzündlichen Erkrankungen.

6.3. Vermehrte NGF-Produktion von Astrozyten nach Interaktion mit Th1- und Th2-Zellen

Da die Astrozyten-induzierte T-Zell-Apoptose nur einen Teil der ins ZNS eindringenden T-Zellen beseitigt und die CTLA-4-Induktion nicht zu einer völligen Abschaltung der T-Zellproliferation und Effektorfunktion führt, stand die Frage, ob es Mechanismen gibt, mit denen das ZNS schädliche Folgen einer T-Zellinfiltration durch die überlebenden und noch immer aktiven T-Zellen abwenden kann. Daher wurden Interaktionen von Astrozyten mit Th1- und Th2-Zellen *in vitro* untersucht. Wir konnten zeigen, dass Astrozyten durch die Interaktion mit Th1- wie auch Th2-Zellen vermehrt NGF produzieren (**Anlage 10**, Fig. 1). NGF fördert das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von peripheren und zentralen Neuronen [Levi-Montalcini, 96]. Wird Krallenäffchen NGF intracerebroventricular verabreicht, verzögert es den Krankheitsbeginn einer induzierten EAE und reduziert die Entstehung von Läsionen [Villoslada, 00]. Werden Mäuse nach einer erfolgten EAE-Induktion intraperitoneal mit NGF behandelt, verzögert das den Krankheitsbeginn und die Krankheit verläuft milder [Arredondo, 01]. Mehr noch, enzephalitogene MBP-spezifische T-Zellen, die retroviral zu einer starken NGF-Sekretion transduziert wurden, sind nicht mehr in der Lage, EAE zu induzieren und unterdrücken sogar die EAE-Induktion durch nicht-transduzierte MBP-spezifische T-Zellen in Ratten [Flügel, 01]. Offensichtlich wirkt NGF in Tiermodellen neuroinflammatorischer Erkrankungen protektiv. Die von uns beobachtete Induktion der astrozytären NGF-Produktion durch T-Zellen tritt nur auf, wenn die Astrozyten bereits durch IFN- γ aktiviert sind (**Anlage 10**, Fig. 1). Diese Aktivierung führt zur Expression von MHC-II (**Anlage 10**, Fig. 2) und B7-1 (eigene, nicht publizierte Daten), so dass die Astrozyten in der Lage sind, Antigen zu präsentieren und mit Hilfe costimulatorischer Moleküle T-Zellen optimal zu aktivieren. Die NGF-Induktion tritt weiterhin nur auf, wenn ein direkter Kontakt zwischen Astrozyten und T-Zellen unter Anwesenheit von Antigen möglich ist. Naive T-Zellen sind nicht in der Lage, die NGF-Produktion durch Astrozyten zu verstärken, was jedoch nicht verwundert, da Astrozyten nicht mit naiven T-Zellen interagieren können [Aloisi, 98; Aloisi, 99b]. Darüber hinaus würde eine solche Interaktion auch keinen Sinn machen, weil nur aktivierte T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden können.

Die Zytokine IL-4 und IL-10 einerseits sowie IFN- γ andererseits gelten als NGF-induzierend bzw. -hemmend [Brodie, 96]. Deshalb wurde ihr Einfluss mittels Antikörperblockade getestet. Keines dieser Zytokine war an dem hier beobachteten Phänomen beteiligt (**Anlage 10**, Fig. 1). Das legt nahe, dass die MHC-II-Peptid-TCR-Interaktion selbst für die Hochregulation der NGF-Produktion in Astrozyten verantwortlich ist. Alternativ dazu wären andere zelluläre Interaktionen, die zwischen T-Zellen und aktivierten Astrozyten auftreten, als Ursache denkbar. Es ist bekannt, dass IFN- γ auf Astrozyten die Expression von VCAM-1 induziert [Lee, 99] und die konstitutive Expression von ICAM-1 hochreguliert [Aloisi, 98]. Es stellte sich die Frage, ob eine

Interaktion mit T-Zellen über eines dieser Moleküle für die Hochregulation der NGF-Produktion verantwortlich war. Deshalb wurden ICAM-1-Moleküle bzw. VCAM-1-Moleküle auf Astrozyten durch Antikörper kreuzvernetzt (**Anlage 10**, Fig. 2). Es wurde jedoch keine Erhöhung der NGF-Produktion beobachtet, was wahrscheinlich macht, dass doch die MHC-II-TCR-Interaktion für die Erhöhung der NGF-Produktion nach Interaktion mit T-Zellen verantwortlich ist. Durch die T-Zell-induzierte NGF-Produktion können Astrozyten evtl. neurodegenerativen Effekten, die durch T-Zellen hervorgerufen werden, entgegenwirken. Das kann von besonderer Bedeutung sein, wenn sich eine T-Zell-vermittelte Entzündung nicht vermeiden lässt, wie z.B. bei einer schweren viralen oder bakteriellen Infektion, welche ungeachtet der Blut-Hirn-Schranke das ZNS erreichen konnte.

7. Zusammenfassung

Diese Arbeit leistet Beiträge zu 3 großen Themenbereichen. Diese sind 1. die Differenzierung von T-Helferzellen; 2. die Autoimmunität und Versuche, die Toleranz wiederherzustellen sowie 3. das komplexe Regelsystem, welches das ZNS zum Schutz vor T-Zell-vermittelten Entzündungen entwickelt hat. Auf dem dritten Bereich liegt der besondere Schwerpunkt der Arbeit.

T-Helferzellen sind essentielle Spieler der adaptiven Immunität. Ihre Aktivierung und Effektorfunktion zur Abwehr von Infektionen werden strikt reguliert. Zum Schutz gegen autoreaktive Angriffe auf körpereigenes Gewebe haben sich zahlreiche Toleranzmechanismen entwickelt. Kommt es dennoch zum Bruch der Toleranz und zu einer Th1-vermittelten Autoimmunreaktion, bietet die Verschiebung der Immunantwort in Richtung Th2 eine therapeutische Möglichkeit, die entzündliche Reaktion zu stoppen. Diese Arbeit stellt eine solche Immunmodulation durch Eingriffe in die T-Zellsignaltransduktion durch Tyrosinkinaseinhibitoren vor. Der praktische Einsatz dieser antigen-unspezifischen Immunmodulatoren ist jedoch nicht unproblematisch, da auch wünschenswerte, protektive Immunreaktionen im Organismus beeinträchtigt werden könnten.

Dies kann durch einen antigen-spezifischen Ansatz zur Wiederherstellung der Toleranz durch orale Antigengabe umgangen werden, ein Therapiekonzept, das bereits in klinischen Studien bei RA und MS mit unterschiedlichem Erfolg angewendet wurde. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass ein Therapieerfolg der oralen Gabe von Collagen Typ II zwar nicht vor Therapiebeginn, jedoch noch während der Therapie, anhand des Abfalls der anti-Collagen II- Antikörpertiter im Patientenserum prognostiziert werden kann.

Das ZNS gehört zu den „immunprivilegierten“ Geweben, in denen eine entzündliche Immunreaktion dringend vermieden werden sollte, da sie irreversible Schäden hervorrufen könnte. Diese Gewebe besitzen über den „normalen“ Schutz vor autoreaktiven T-Zellen hinaus Mechanismen, um T-Zell-vermittelte Entzündungen abzuwenden. Das „Immunprivileg“ des ZNS beruht auf zahlreichen, sich ergänzenden Mechanismen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Mechanismen der Interaktion von T-Helferzellen mit ZNS-Gewebe und den besonderen Eigenschaften der Zellen, die das ZNS-ansässige Immunsystem bilden: Mikrogliazellen und Astrozyten. Diese Zellen unterscheiden sich von APCs der Peripherie dadurch, dass sie zur Ausübung von Immunfunktionen erst aktiviert werden müssen. In organotypischen Hirnschnittkulturen mit einem weitgehend erhaltenen Nervenfasertrakt wurde der Einfluss von antigen-spezifisch aktivierten, MBP-spezifischen, transgenen T-Zellen und unspezifisch aktivierten Wildtyp-T-Zellen in Co-Kulturexperimenten studiert. Hier zeigte sich, dass sowohl antigen-spezifische als auch unspezifische T-Zellen Mikrogliazellen aktivieren und axonale Schäden hervorrufen können, wobei antigenspezifische T-Zellen dabei

effektiver zu sein scheinen, da sie bei ungleich geringerer Aktivierung gleiche Effekte erzielen wie antigen-unspezifische. Co-Kulturexperimente mit MBP-spezifischen Th1- und Th2-Zellen zeigen hingegen unterschiedliche Reaktionen seitens der Mikrogliazellen. Während Th1-Zellen Mikrogliazellen aktivieren, tun Th2-Zellen dies nicht, sondern wirken teilweise sogar einer Mikrogliazellaktivierung entgegen. Die beobachtete differentielle Expression von mikroglialen costimulatorischen Molekülen könnte einen Einfluss auf die Immunreaktion im ZNS haben. Die in dieser Arbeit dargestellten Experimente zum Einfluss pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in Hirnschnittkulturen zeigen, dass Mikrogliaaktivierung und die Schädigung axonaler Verbindungen nicht streng korrelieren.

Es war bekannt, dass Astrozyten verglichen mit Mikrogliazellen *in vivo* einer stärkeren Aktivierung bedürfen, um als APCs fungieren zu können und andererseits in der Lage sind, Mikrogliazellen zu deaktivieren. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sie darüber hinaus T-Zell-vermittelte Entzündungen abschwächen können. Bekanntermaßen wird die Blut-Hirn-Schranke durch die am Endothel fest verankerten Endfüßchen der Astrozytenfortsätze gebildet. Somit tragen Astrozyten über ihre Funktion als mechanische Barriere hinaus zum Immunprivileg des ZNS bei, wenn sie wie hier gezeigt durch Expression von FasL zur Apoptose von T-Zellen, die ins ZNS eindringen, führen. Die Arbeit zeigt weiterhin, dass nach Passieren dieser ersten Barriere weitere Schutzmechanismen einer T-Zell-vermittelten Entzündung entgegenwirken. Dafür scheint die Induktion der Hochregulation von CTLA-4 auf den T-Helferzellen durch Astrozyten von entscheidender Bedeutung zu sein. Dieses costimulatorische Molekül reguliert aktivierte T-Zellen herunter, was sich anhand einer verminderten Proliferation und Zytokinproduktion nachweisen ließ. Nicht direkt die T-Zellen beeinflussend, jedoch als ZNS-protektiv zu bewerten, ist der hier vorgestellte Befund einer erhöhten Produktion von NGF durch Astrozyten nach antigenspezifischem Kontakt mit Th1- und Th2-Zellen, welche den Folgen einer T-Zell-vermittelten Entzündung entgegenwirken kann, indem es das Überleben des Nervengewebes unterstützt. Dieser Mechanismus kann eine entscheidende neuroprotektive Funktion von Astrozyten darstellen, nämlich dann, wenn eine T-Zell-vermittelte Immunantwort nicht zu vermeiden ist, wie z.B. bei schweren Infektionen im ZNS.

Die Arbeit stellt diese Ergebnisse in 5 Kapiteln dar. Sie geben eine Einführung in die als Anlagen enthaltenen 10 Publikationsmanuskripte. Darüber hinaus werden Details nicht veröffentlichter experimenteller Daten präsentiert.

8. Literaturverzeichnis anderer Autoren

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. und Pober, J. S. (2000): Cellular and molecular immunology, 4th. Auflage, W.B. Saunders Company, Philadelphia, P.A., ISBN: 0-7216-8233-2.

Abe, N.; Katamura, K.; Shintaku, N.; Fukui, T.; Kiyomasu, T.; Iio, J.; Ueno, H.; Tai, G.; Mayumi, M. und Furusho, K. (1997): Prostaglandin E2 and IL-4 provide naive CD4+ T cells with distinct inhibitory signals for the priming of IFN-gamma production, *Cell.Immunol.* 181 [1], Seite 86-92.

Abramson, S. B. und Amin, A. (2002): Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage, *Rheumatology.(Oxford)* 41 [9], Seite 972-980. URL: PM:12209029

Aharoni, R.; Teitelbaum, D.; Sela, M. und Arnon, R. (1997): Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94 [20], Seite 10821-10826.

Aktas, O.; Waiczies, S.; Smorodchenko, S.; Dörr, J.; Seeger, B.; Prozorovski, T.; Sallach, S.; Endres, M.; Brocke, S.; Nitsch, R. und Zipp, F. (2003): Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin, *J.Exp.Med.* 197 [6], Seite 725-733.

Alcazar, A.; Regidor, I.; Masjuan, J.; Salinas, M. und Alvarez-Cermeno, J. C. (1998): Induction of apoptosis by cerebrospinal fluid from patients with primary-progressive multiple sclerosis in cultured neurons, *Neurosci.Lett.* 255 [2], Seite 75-78.

Alcazar, A.; Regidor, I.; Masjuan, J.; Salinas, M. und Alvarez-Cermeno, J. C. (2000): Axonal damage induced by cerebrospinal fluid from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis, *J.Neuroimmunol.* 104 [1], Seite 58-67.

Aloisi, F.; Penna, G.; Cerase, J.; Menendez Iglesias, B. und Adorini, L. (1997): IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes, *J.Immunol.* 159 [4], Seite 1604-1612.

Aloisi, F.; Penna, G.; Polazzi, E.; Minghetti, L. und Adorini, L. (1999a): CD40-CD154 interaction and IFN-gamma are required for IL-12 but not prostaglandin E2 secretion by microglia during antigen presentation to Th1 cells, *J.Immunol.* 162 [3], Seite 1384-1391.

Aloisi, F.; Ria, F. und Adorini, L. (2000): Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes, *Immunol.Today* 21 [3], Seite 141-147.

Aloisi, F.; Ria, F.; Columba, Cabezas S.; Hess, H.; Penna, G. und Adorini, L. (1999b): Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4+ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation, *Eur.J.Immunol.* 29 [9], Seite 2705-2714.

- Aloisi, F.; Ria, F.; Penna, G. und Adorini, L. (1998): Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation, *J.Immunol.* 160 [10], Seite 4671-4680.
- Anderson, C. C.; Carroll, J. M.; Gallucci, S.; Ridge, J. P.; Cheever, A. W. und Matzinger, P. (2001): Testing time-, ignorance-, and danger-based models of tolerance, *J.Immunol.* 166 [6], Seite 3663-3671. URL: PM:11238605
- Anderson, C. C. und Matzinger, P. (2000): Danger: the view from the bottom of the cliff, *Semin.Immunol.* 12 [3], Seite 231-238. URL: PM:10910744
- Arredondo, L. R.; Deng, C.; Ratts, R. B.; Lovett-Racke, A. E.; Holtzman, D. M. und Racke, M. K. (2001): Role of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Eur.J.Immunol.* 31 [2], Seite 625-633. URL: PM:11180128
- Aschkenazi, S.; Straszewski, S.; Verwer, K. M.; Foellmer, H.; Rutherford, T. und Mor, G. (2002): Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells, *Biol.Reprod.* 66 [6], Seite 1853-1861. URL: PM:12021072
- Assenmacher, M.; Löhning, M.; Scheffold, A.; Manz, R. A.; Schmitz, J. und Radbruch, A. (1998a): Sequential production of IL-2, IFN-gamma and IL-10 by individual staphylococcal enterotoxin B-activated T helper lymphocytes, *Eur.J.Immunol.* 28 [5], Seite 1534-1543.
- Assenmacher, M.; Löhning, M.; Scheffold, A.; Richter, A.; Miltenyi, S.; Schmitz, J. und Radbruch, A. (1998b): Commitment of individual Th1-like lymphocytes to expression of IFN-gamma versus IL-4 and IL-10: selective induction of IL-10 by sequential stimulation of naive Th cells with IL-12 and IL-4, *J.Immunol.* 161 [6], Seite 2825-2832.
- Backlund, J.; Carlsen, S.; Hoger, T.; Holm, B.; Fugger, L.; Kihlberg, J.; Burkhardt, H. und Holmdahl, R. (2002): Predominant selection of T cells specific for the glycosylated collagen type II epitope (263-270) in humanized transgenic mice and in rheumatoid arthritis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99 [15], Seite 9960-9965. URL: PM:12089323
- Barna, B. P.; Pettay, J.; Barnett, G. H.; Zhou, P.; Iwasaki, K. und Estes, M. L. (1994): Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor, *J.Neuroimmunol.* 50 [1], Seite 101-107.
- Bechmann, I.; Lossau, S.; Steiner, B.; Mor, G.; Gimsa, U. und Nitsch, R. (2000): Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and Fas ligand (CD95L) expression but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration, *Glia* 32 [1], Seite 25-41.
- Bechmann, I.; Peter, S.; Beyer, M.; Gimsa, U. und Nitsch, R. (2001): Presence of B7--2 (CD86) and lack of B7--1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo, *FASEB J.* 15 [6], Seite 1086-1088. URL: PM:11292676
- Beyer, M.; Gimsa, U.; Eyüpoglu, I. Y.; Hailer, N. P. und Nitsch, R. (2000): Phagocytosis of neuronal or glial debris by microglial cells: Upregulation of MHC class II expression and multinuclear giant cell formation in vitro, *Glia* 31 [3], Seite 262-266.
- Biddle, F. und Stevenson, J. P. (1966): Flocculation of influenza viruses by horse serum inhibitor, *Nature* 209 [29], Seite 1223-1225. URL: PM:5956312

- Boje, K. M. und Arora, P. K. (1992): Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death, *Brain Res.* 587 [2], Seite 250-256.
- Bonthius, D. J.; Karacay, B.; Dai, D. und Pantazis, N. J. (2003): FGF-2, NGF and IGF-1, but not BDNF, utilize a nitric oxide pathway to signal neurotrophic and neuroprotective effects against alcohol toxicity in cerebellar granule cell cultures, *Brain Res.Dev.Brain Res.* 140 [1], Seite 15-28. URL: PM:12524173
- Boots, A. M.; Verheijden, G. F.; Schoningh, R.; van Staveren, C. J.; Bos, E.; Elewaut, D.; de Keyser, F.; Veys, E.; Joosten, I. und Rijnders, A. W. (1997): Selection of self-reactive peptides within human aggrecan by use of a HLA-DRB1*0401 peptide binding motif, *J.Autoimmun.* 10 [6], Seite 569-578. URL: PM:9451596
- Bretscher, P. und Cohn, M. (1970): A theory of self-nonsel self discrimination, *Science* 169 [950], Seite 1042-1049. URL: PM:4194660
- Brodie, C. (1996): Differential effects of Th1 and Th2 derived cytokines on NGF synthesis by mouse astrocytes, *FEBS Lett.* 394 [2], Seite 117-120.
- Brodie, C.; Goldreich, N.; Haiman, T. und Kazimirsky, G. (1998): Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion, *J.Neuroimmunol.* 81 [1-2], Seite 20-30.
- Cannella, B.; Hoban, C. J.; Gao, Y. L.; Garcia Arenas, R.; Lawson, D.; Marchionni, M.; Gwynne, D. und Raine, C. S. (1998): The neuregulin, glial growth factor 2, diminishes autoimmune demyelination and enhances remyelination in a chronic relapsing model for multiple sclerosis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95 [17], Seite 10100-10105.
- Celis, L.; Vandevyver, C.; Geusens, P.; Dequeker, J.; Raus, J. und Zhang, J. (1997): Clonal expansion of mycobacterial heat-shock protein-reactive T lymphocytes in the synovial fluid and blood of rheumatoid arthritis patients, *Arthritis Rheum.* 40 [3], Seite 510-519. URL: PM:9082939
- Chabot, S.; Williams, G. und Yong, V. W. (1997): Microglial production of TNF-alpha is induced by activated T lymphocytes. Involvement of VLA-4 and inhibition by interferonbeta-1b, *J.Clin.Invest.* 100 [3], Seite 604-612.
- Chambers, C. A.; Krummel, M. F.; Boitel, B.; Hurwitz, A.; Sullivan, T. J.; Fournier, S.; Cassell, D.; Brunner, M. und Allison, J. P. (1996): The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses, *Immunol.Rev.* 153, Seite 27-46. URL: PM:9010718
- Chang, T. T.; Jabs, C.; Sobel, R. A.; Kuchroo, V. K. und Sharpe, A. H. (1999): Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J.Exp.Med.* 190 [5], Seite 733-740.
- Chao, C. C.; Hu, S.; Sheng, W. S.; Bu, D.; Bukrinsky, M. I. und Peterson, P. K. (1996): Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism, *Glia* 16 [3], Seite 276-284.
- Chen, Y.; Hancock, W. W.; Marks, R.; Gonnella, P. und Weiner, H. L. (1998): Mechanisms of recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis: T cell deletion and immune deviation in myelin basic protein T cell receptor transgenic mice, *J.Neuroimmunol.* 82 [2], Seite 149-159.

- Choi, C.; Park, J. Y.; Lee, J.; Lim, J. H.; Shin, E. C.; Ahn, Y. S.; Kim, C. H.; Kim, S. J.; Kim, J. D.; Choi, I. S. und Choi, I. H. (1999): Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFN-gamma, *J.Immunol.* 162 [4], Seite 1889-1895. URL: PM:9973455
- Coffman, R. L.; Mocci, S. und O'Garra, A. (1999): The stability and reversibility of Th1 and Th2 populations, *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 238, Seite 1-12. URL: PM:10087647
- Coltman, B. W. und Ide, C. F. (1996): Temporal characterization of microglia, IL-1 beta-like immunoreactivity and astrocytes in the dentate gyrus of hippocampal organotypic slice cultures, *Int.J.Dev.Neurosci.* 14 [6], Seite 707-719.
- Com, E.; Bourgeon, F.; Evrard, B.; Ganz, T.; Collet, D.; Jegou, B. und Pineau, C. (2003): Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans, *Biol.Reprod.* 68 [1], Seite 95-104. URL: PM:12493700
- Constant, S. L. und Bottomly, K. (1997): Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches, *Annu.Rev.Immunol.* 15, Seite 297-322.
- Coqueret, O.; Petit-Frere, C.; Lagente, V.; Moumen, M.; Mencia-Huerta, J. M. und Braquet, P. (1994): Modulation of IgE production in the mouse by beta 2-adrenoceptor agonist, *Int.Arch.Allergy Immunol.* 105 [2], Seite 171-176. URL: PM:7920017
- Cremer, M. A.; Rosloniec, E. F. und Kang, A. H. (1998): The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease, *J.Mol.Med.* 76 [3-4], Seite 275-288. URL: PM:9535561
- Creusot, R. J.; Mitchison, N. A. und Terazzini, N. M. (2002): The immunological synapse, *Mol.Immunol.* 38 [12-13], Seite 997-1002. URL: PM:12009579
- Dayer, J. M. (2002): Interleukin 1 or tumor necrosis factor-alpha: which is the real target in rheumatoid arthritis?, *J.Rheumatol.Suppl* 65, Seite 10-15. URL: PM:12236616
- De Groot, C. J.; Montagne, L.; Barten, A. D.; Sminia, P. und Van Der Valk, P. (1999): Expression of transforming growth factor (TGF)-beta1, -beta2, and -beta3 isoforms and TGF-beta type I and type II receptors in multiple sclerosis lesions and human adult astrocyte cultures, *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 58 [2], Seite 174-187.
- de Jong, B. A.; Huizinga, T. W.; Bollen, E. L.; Uitdehaag, B. M.; Bosma, G. P.; van Buchem, M. A.; Remarque, E. J.; Burgmans, A. C.; Kalkers, N. F.; Polman, C. H. und Westendorp, R. G. (2002): Production of IL-1beta and IL-1Ra as risk factors for susceptibility and progression of relapse-onset multiple sclerosis, *J.Neuroimmunol.* 126 [1-2], Seite 172-179. URL: PM:12020968
- de Jong, R.; Bezemer, A. C.; Zomerdijk, T. P.; Pouw-Kraan, T.; Ottenhoff, T. H. und Nibbering, P. H. (1996): Selective stimulation of T helper 2 cytokine responses by the anti-psoriasis agent monomethylfumarate, *Eur.J.Immunol.* 26 [9], Seite 2067-2074. URL: PM:8814248
- De Keyser, J.; Wilczak, N.; Leta, R. und Streetland, C. (1999): Astrocytes in multiple sclerosis lack beta-2 adrenergic receptors, *Neurology* 53 [8], Seite 1628-1633.
- Demeure, C. E.; Yang, L. P.; Desjardins, C.; Raynauld, P. und Delespesse, G. (1997): Prostaglandin E2 primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines, *Eur.J.Immunol.* 27 [12], Seite 3526-3531.

- Diekmann, S.; Nitsch, R. und Ohm, T. G. (1994): The organotypic entorhinal-hippocampal complex slice culture of adolescent rats. A model to study transcellular changes in a circuit particularly vulnerable in neurodegenerative disorders, *J.Neural Transm.Suppl.* 44, Seite 61-71.
- Eddleston, M. und Mucke, L. (1993): Molecular profile of reactive astrocytes - implications for their role in neurologic disease, *Neuroscience* 54 [1], Seite 15-36.
- Fabry, Z.; Topham, D. J.; Fee, D.; Herlein, J.; Carlino, J. A.; Hart, M. N. und Sriram, S. (1995): TGF-beta 2 decreases migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo, *J.Immunol.* 155 [1], Seite 325-332.
- Fairchild, P. J. und Wraith, D. C. (1996): Lowering the tone: mechanisms of immunodominance among epitopes with low affinity for MHC, *Immunol.Today* 17 [2], Seite 80-85. URL: PM:8808055
- Falcone, M. und Bloom, B. R. (1997): A T helper cell 2 (Th2) immune response against non-self antigens modifies the cytokine profile of autoimmune T cells and protects against experimental allergic encephalomyelitis, *J.Exp.Med.* 185 [5], Seite 901-907.
- Ferguson, T. A.; Green, D. R. und Griffith, T. S. (2002): Cell death and immune privilege, *Int.Rev.Immunol.* 21 [2-3], Seite 153-172. URL: PM:12424841
- Flügel, A.; Matsumuro, K.; Neumann, H.; Klinkert, W. E.; Birnbacher, R.; Lassmann, H.; Otten, U. und Wekerle, H. (2001): Anti-inflammatory activity of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of monocyte transendothelial migration, *Eur.J.Immunol.* 31 [1], Seite 11-22. URL: PM:11169433
- Frohm, E. M.; Vayuvegula, B.; Gupta, S. und van den Noort S. (1988): Norepinephrine inhibits gamma-interferon-induced major histocompatibility class II (Ia) antigen expression on cultured astrocytes via beta-2-adrenergic signal transduction mechanisms, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85 [4], Seite 1292-1296.
- Gaglia, J. L.; Greenfield, E. A.; Mattoo, A.; Sharpe, A. H.; Freeman, G. J. und Kuchroo, V. K. (2000): Intercellular adhesion molecule 1 is critical for activation of CD28-deficient T cells, *J.Immunol.* 165 [11], Seite 6091-6098. URL: PM:11086041
- Gimsa, U.; Grotzinger, I. und Gimsa, J. (1996): Two evolutionary strategies of influenza viruses to escape host non-specific inhibitors: alteration of hemagglutinin or neuraminidase specificity, *Virus Res.* 42 [1-2], Seite 127-135. URL: PM:8806180
- Gimsa, U. C.; Mitchison, N. A. und Allen, R. (1997): Pharmaceutical products containing protein tyrosine kinase inhibitors and anti-CD4 antibodies, *Intern.Pat.Applic. PCT/GB97/02695*.
- Girvin, A. M.; Dal Canto, M. C.; Rhee, L.; Salomon, B.; Sharpe, A.; Bluestone, J. A. und Miller, S. D. (2000): A critical role for B7/CD28 costimulation in experimental autoimmune encephalomyelitis: a comparative study using costimulatory molecule-deficient mice and monoclonal antibody blockade, *J.Immunol.* 164 [1], Seite 136-143.
- Gisone, P.; Boveris, A. D.; Dubner, D.; Perez, M. R.; Robello, E. und Puntarulo, S. (2003): Early neuroprotective effect of nitric oxide in developing rat brain irradiated in utero, *Neurotoxicology* 24 [2], Seite 245-253. URL: PM:12606296
- Glabinski, A. R.; Balasingam, V.; Tani, M.; Kunkel, S. L.; Strieter, R. M.; Yong, V. W. und Ransohoff, R. M. (1996): Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is

expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain, *J.Immunol.* 156 [11], Seite 4363-4368.

Glant, T.; Csongor, J. und Szucs, T. (1980): Immunopathologic role of proteoglycan antigens in rheumatoid joint disease, *Scand.J.Immunol.* 11 [3], Seite 247-252. URL: PM:9537052

Greenwald, R. J.; Boussiotis, V. A.; Liorbach, R. B.; Abbas, A. K. und Sharpe, A. H. (2001): CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo, *Immunity.* 14 [2], Seite 145-155. URL: PM:11239447

Greenwald, R. J.; Oosterwegel, M. A.; van der, Woude D.; Kubal, A.; Mandelbrot, D. A.; Boussiotis, V. A. und Sharpe, A. H. (2002): CTLA-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response, *Eur.J.Immunol.* 32 [2], Seite 366-373. URL: PM:11807776

Griffith, T. S.; Brunner, T.; Fletcher, S. M.; Green, D. R. und Ferguson, T. A. (1995): Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege, *Science* 270 [5239], Seite 1189-1192. URL: PM:7502042

Guevara, B. H.; Cespedes, G. C. und Cubeddu, L. X. (2002): Treatment with 7-nitroindazole enhances kainic acid induced cholinergic neurotoxicity in the rat striatum: a neuroprotective role for neuronal nitric oxide, *Cell Mol.Neurobiol.* 22 [5-6], Seite 827-834. URL: PM:12585700

Guller, S. und LaChapelle, L. (1999): The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal-fetal interfaces, *Semin.Reprod.Endocrinol.* 17 [1], Seite 39-44. URL: PM:10406074

Hailer, N. P.; Heppner, F. L.; Haas, D. und Nitsch, R. (1998): Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system, *Brain Pathol.* 8 [3], Seite 459-474.

Hailer, N. P.; Järhult, J. D. und Nitsch, R. (1996): Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures, *Glia* 18 [4], Seite 319-331.

Hayashi, M.; Luo, Y.; Laning, J.; Strieter, R. M. und Dorf, M. E. (1995): Production and function of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines in murine glial cells, *J.Neuroimmunol.* 60 [1-2], Seite 143-150.

Heppner, F. L.; Skutella, T.; Hailer, N. P. und Nitsch, R. (1998): Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures, *Eur.J.Neurosci.* 10 [10], Seite 3284-3290.

Hickey, W. F.; Hsu, B. L. und Kimura, H. (1991): T-lymphocyte entry into the central nervous system, *J.Neurosci.Res.* 28 [2], Seite 254-260.

Hsieh, C. S.; Macatonia, S. E.; Tripp, C. S.; Wolf, S. F.; O'Garra, A. und Murphy, K. M. (1993): Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages, *Science* 260, Seite 547-9.

Hu-Li, J.; Huang, H.; Ryan, J. und Paul, W. E. (1997): In differentiated CD4+ T cells, interleukin 4 production is cytokine-autonomous, whereas interferon gamma production is cytokine-dependent, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94 [7], Seite 3189-3194.

- Janeway, C. A., Jr. (1992): The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self, *Immunol.Today* 13 [1], Seite 11-16. URL: PM:1739426
- Janeway, C. A., Jr. und Medzhitov, R. (2002): Innate immune recognition, *Annu.Rev.Immunol.* 20, Seite 197-216. URL: PM:11861602
- Jones, D. B.; Coulson, A. F. und Duff, G. W. (1993): Sequence homologies between hsp60 and autoantigens, *Immunol.Today* 14 [3], Seite 115-118. URL: PM:8466626
- Kao, C. Y.; Chen, Y.; Zhao, Y. H. und Wu, R. (2003): ORFeome Based Search of Airway Epithelial Cell-Specific Novel Human {beta}-Defensin Genes, *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* URL: PM:12600824
- Kappos, L.; Comi, G.; Panitch, H.; Oger, J.; Antel, J.; Conlon, P. und Steinman, L. (2000): Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. The Altered Peptide Ligand in Relapsing MS Study Group, *Nat.Med.* 6 [10], Seite 1176-1182. URL: PM:11017151
- Karandikar, N. J.; Vanderlugt, C. L.; Walunas, T. L.; Miller, S. D. und Bluestone, J. A. (1996): CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease, *J.Exp.Med.* 184 [2], Seite 783-788. URL: PM:8760834
- Karussis, D.; Abramsky, O.; Rosenthal, Y.; Mizrachi, Koll R. und Ovadia, H. (1999): Linomide downregulates autoimmunity through induction of TH2 cytokine production by lymphocytes, *Immunol.Lett.* 67 [3], Seite 203-208.
- Katamura, K.; Shintaku, N.; Yamauchi, Y.; Fukui, T.; Ohshima, Y.; Mayumi, M. und Furusho, K. (1995): Prostaglandin E2 at priming of naive CD4+ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN-gamma and IL-2, but not IL-4 and IL-5, *J.Immunol.* 155 [10], Seite 4604-4612.
- Kauma, S. W.; Huff, T. F.; Hayes, N. und Nilkaeo, A. (1999): Placental Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus, *J.Clin.Endocrinol.Metab* 84 [6], Seite 2188-2194. URL: PM:10372730
- Khoruts, A.; Miller, S. D. und Jenkins, M. K. (1995): Neuroantigen-specific Th2 cells are inefficient suppressors of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by effector Th1 cells, *J.Immunol.* 155 [10], Seite 5011-5017.
- Kim, H. J.; Krenn, V.; Steinhauser, G. und Berek, C. (1999): Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis, *J.Immunol.* 162 [5], Seite 3053-3062. URL: PM:10072558
- Kitani, A.; Chua, K.; Nakamura, K. und Strober, W. (2000): Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells, *J.Immunol.* 165 [2], Seite 691-702. URL: PM:10878341
- Kluge, A.; Hailer, N. P.; Horvath, T. L.; Bechmann, I. und Nitsch, R. (1998): Tracing of the entorhinal-hippocampal pathway in vitro, *hippocampus* 8, Seite 57-68.
- Kohji, T. und Matsumoto, Y. (2000): Coexpression of Fas/FasL and Bax on brain and infiltrating T cells in the central nervous system is closely associated with apoptotic cell death during autoimmune encephalomyelitis, *J.Neuroimmunol.* 106 [1-2], Seite 165-171. URL: PM:10814794

- Kohji, T.; Tanuma, N.; Aikawa, Y.; Kawazoe, Y.; Suzuki, Y.; Kohyama, K. und Matsumoto, Y. (1998): Interaction between apoptotic cells and reactive brain cells in the central nervous system of rats with autoimmune encephalomyelitis, *J.Neuroimmunol.* 82 [2], Seite 168-174.
- Kopp, E. und Medzhitov, R. (2002): Skin antibiotics get in the loop, *Nat.Med.* 8 [12], Seite 1359-1360. URL: PM:12457178
- Krause, I.; Blank, M. und Shoenfeld, Y. (2000): Immunomodulation of experimental autoimmune diseases via oral tolerance, *Crit.Rev.Immunol.* 20 [1], Seite 1-16. URL: PM:10770268
- Kuchroo, V. K.; Das, M. P.; Brown, J. A.; Ranger, A. M.; Zamvil, S. S.; Sobel, R. A.; Weiner, H. L.; Nabavi, N. und Glimcher, L. H. (1995): B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy, *Cell* 80 [5], Seite 707-718.
- Lafaille, J. J.; Keere, F. V.; Hsu, A. L.; Baron, J. L.; Haas, W.; Raine, C. S. und Tonegawa, S. (1997): Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease, *J.Exp.Med.* 186 [2], Seite 307-312.
- Lafaille, J. J.; Nagashima, K.; Katsuki, M. und Tonegawa, S. (1994): High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice, *Cell* 78 [3], Seite 399-408.
- Lassmann, H.; Zimprich, F.; Vass, K. und Hickey, W. F. (1991): Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans, *J.Neurosci.Res.* 28 [2], Seite 236-243. URL: PM:2033652
- Lee, S. J. und Benveniste, E. N. (1999): Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system, *J.Neuroimmunol.* 98 [2], Seite 77-88.
- Levi-Montalcini, R.; Skaper, S. D.; Dal Toso, R.; Petrelli, L. und Leon, A. (1996): Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokin, *Trends Neurosci.* 19 [11], Seite 514-520. URL: PM:8931279
- Liu, G. Y.; Fairchild, P. J.; Smith, R. M.; Prowle, J. R.; Kioussis, D. und Wraith, D. C. (1995): Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance, *Immunity* 3 [4], Seite 407-415.
- MacDonald, K. P.; Nishioka, Y.; Lipsky, P. E. und Thomas, R. (1997): Functional CD40 ligand is expressed by T cells in rheumatoid arthritis, *J.Clin.Invest* 100 [9], Seite 2404-2414. URL: PM:9410920
- Mantyh, P. W.; Rogers, S. D.; Allen, C. J.; Catton, M. D.; Ghilardi, J. R.; Levin, L. A.; Maggio, J. E. und Vigna, S. R. (1995): Beta 2-adrenergic receptors are expressed by glia in vivo in the normal and injured central nervous system in the rat, rabbit, and human, *J.Neurosci.* 15 [1 Pt 1], Seite 152-164.
- Marrack, P.; Kappler, J. und Kotzin, B. L. (2001): Autoimmune disease: why and where it occurs, *Nat.Med.* 7 [8], Seite 899-905. URL: PM:11479621
- Martin, D. und Near, S. L. (1995): Protective effect of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on experimental allergic encephalomyelitis in rats, *J.Neuroimmunol.* 61 [2], Seite 241-245. URL: PM:7593560

- Mason, D. (1998): A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor, *Immunol.Today* 19 [9], Seite 395-404. URL: PM:9745202
- Matzinger, P. (1994): Tolerance, danger, and the extended family, *Annu.Rev.Immunol.* 12, Seite 991-1045. URL: PM:8011301
- Matzinger, P. (2002): The danger model: a renewed sense of self, *Science* 296 [5566], Seite 301-305. URL: PM:11951032
- McHeyzer-Williams, M. G. und Davis, M. M. (1995): Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo, *Science* 268 [5207], Seite 106-111. URL: PM:7535476
- McHugh, S. M.; Rifkin, I. R.; Deighton, J.; Wilson, A. B.; Lachmann, P. J.; Lockwood, C. M. und Ewan, P. W. (1995): The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 (Th2) and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen- and antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures, *Clin.Exp.Immunol.* 99 [2], Seite 160-167. URL: PM:7851006
- Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr. (2000): How does the immune system distinguish self from nonself?, *Semin.Immunol.* 12 [3], Seite 185-188. URL: PM:10910738
- Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr. (2002): Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system, *Science* 296 [5566], Seite 298-300. URL: PM:11951031
- Menard, A.; Paranhos, Baccala G.; Pelletier, J.; Mandrand, B.; Seigneurin, J. M.; Perron, H. und Reiger, F. (1997): A cytotoxic factor for glial cells: a new avenue of research for multiple sclerosis?, *Cell.Mol.Biol.* 43 [6], Seite 889-901.
- Menard, A.; Pierig, R.; Pelletier, J.; Bensa, P.; Belliveau, J.; Mandrand- B; Perron, H. und Rieger, F. (1998): Detection of a gliotoxic activity in the cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients, *Neurosci.Lett.* 245 [1], Seite 49-52.
- Michie, S. A. und Rouse, R. V. (1988): Study of murine T cell migration using the Thy-1 allotypic marker. Demonstration of antigen-specific homing to lymph node germinal centers, *Transplantation* 46 [1], Seite 98-104. URL: PM:2899364
- Miller, S. D.; Vanderlugt, C. L.; Lenschow, D. J.; Pope, J. G.; Karandikar, N. J.; Dal Canto, M. C. und Bluestone, J. A. (1995): Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE, *Immunity.* 3 [6], Seite 739-745.
- Mitchison, A.; Gimsa, U. und Sieper, J. (1995): Oral tolerance from a general perspective, and the possible role of side-effects in the gut, *Inflammopharmacology* 3, Seite 389-392.
- Mitchison, N. A.; Schuhbauer, D. und Müller, B. (1999): Natural and induced regulation of Th1/Th2 balance, *Springer Semin.Immunopathol.* 21 [3], Seite 199-210.
- Mor, G.; Gutierrez, L. S.; Eliza, M.; Kahyaoglu, F. und Arici, A. (1998): Fas-fas ligand system-induced apoptosis in human placenta and gestational trophoblastic disease, *Am.J.Reprod.Immunol.* 40 [2], Seite 89-94. URL: PM:9764350
- Mosmann, T. R.; Cherwinski, H.; Bond, M. W.; Giedlin, M. A. und Coffman, R. L. (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, *J.Immunol.* 136 [7], Seite 2348-2357.

- Müller, B.; Gimsa, U.; Mitchison, N. A.; Radbruch, A.; Sieper, J. und Yin, Z. (1998): Modulating the Th1/Th2 balance in inflammatory arthritis, *Springer Semin.Immunopathol.* 20, Seite 181-196.
- Murphy, E.; Shibuya, K.; Hosken, N.; Openshaw, P.; Maino, V.; Davis, K.; Murphy, K. und O'Garra, A. (1996): Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation, *J.Exp.Med.* 183 [3], Seite 901-913. URL: PM:8642294
- Murphy, K. M.; Heimberger, A. B. und Loh, D. Y. (1990): Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α thymocytes in vivo, *Science* 250 [4988], Seite 1720-1723. URL: PM:2125367
- Murphy, K. M.; Ouyang, W.; Farrar, J. D.; Yang, J.; Ranganath, S.; Asnagli, H.; Afkarian, M. und Murphy, T. L. (2000): Signaling and transcription in T helper development, *Annu.Rev.Immunol.* 18, Seite 451-494. URL: PM:10837066
- Neuhaus, O.; Farina, C.; Yassouridis, A.; Wiendl, H.; Then, Bergh F.; Dose- T; Wekerle, H. und Hohlfeld, R. (2000): Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1- reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 [13], Seite 7452-7457.
- Neumann, H.; Misgeld, T.; Matsumuro, K. und Wekerle, H. (1998): Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 [10], Seite 5779-5784.
- Nguyen, V. T.; Walker, W. S. und Benveniste, E. N. (1998): Post-transcriptional inhibition of CD40 gene expression in microglia by transforming growth factor-beta, *Eur.J.Immunol.* 28 [8], Seite 2537-2548.
- Nitschke, M.; Wiehl, S.; Baer, P. C. und Kreft, B. (2002): Bactericidal activity of renal tubular cells: the putative role of human beta-defensins, *Exp.Nephrol.* 10 [5-6], Seite 332-337. URL: PM:12381917
- O'Garra, A.; Macatonia, S. E.; Hsieh, C. S. und Murphy, K. M. (1993): Regulatory role of IL4 and other cytokines in T helper cell development in an alpha beta TCR transgenic mouse system, *Res.Immunol.* 144, Seite 620-5.
- Oh, L. Y. und Yong, V. W. (1996): Astrocytes promote process outgrowth by adult human oligodendrocytes in vitro through interaction between bFGF and astrocyte extracellular matrix, *Glia* 17 [3], Seite 237-253.
- Ohnishi, Y.; Tsutsumi, A.; Sakamaki, T. und Sumida, T. (2003): T cell epitopes of type II collagen in HLA-DRB1*0101 or DRB1*0405-positive Japanese patients with rheumatoid arthritis, *Int.J.Mol.Med.* 11 [3], Seite 331-335. URL: PM:12579335
- Palma, C.; Minghetti, L.; Astolfi, M.; Ambrosini, E.; Silberstein, F. C.; Manzini, S.; Levi, G. und Aloisi, F. (1997): Functional characterization of substance P receptors on cultured human spinal cord astrocytes: synergism of substance P with cytokines in inducing interleukin-6 and prostaglandin E2 production, *Glia* 21 [2], Seite 183-193.
- Perkins, D.; Wang, Z.; Donovan, C.; He, H.; Mark, D.; Guan, G.; Wang, Y.; Walunas, T.; Bluestone, J.; Listman, J. und . (1996): Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation, *J.Immunol.* 156 [11], Seite 4154-4159. URL: PM:8666782

- Pouw-Kraan, T. C.; Boeije, L. C.; Smeenk, R. J.; Wijdenes, J. und Aarden, L. A. (1995): Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production, *J.Exp.Med.* 181 [2], Seite 775-779.
- Prud'homme, G. J. und Piccirillo, C. A. (2000): The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF- beta1) in autoimmune diseases, *J.Autoimmun.* 14 [1], Seite 23-42.
- Racke, M. K.; Bonomo, A.; Scott, D. E.; Cannella, B.; Levine, A.; Raine, C. S.; Shevach, E. M. und Röcken, M. (1994): Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease, *J.Exp.Med.* 180 [5], Seite 1961-1966.
- Racke, M. K.; Scott, D. E.; Quigley, L.; Gray, G. S.; Abe, R.; June, C. H. und Perrin- PJ (1995): Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis, *J.Clin.Invest* 96 [5], Seite 2195-2203.
- Rogers, G. N.; Pritchett, T. J.; Lane, J. L. und Paulson, J. C. (1983): Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants, *Virology* 131 [2], Seite 394-408. URL: PM:6197808
- Rudolphi, U.; Rzepka, R.; Batsford, S.; Kaufmann, S. H.; von der, Mark K.; Peter, H. H. und Melchers, I. (1997): The B cell repertoire of patients with rheumatoid arthritis. II. Increased frequencies of IgG+ and IgA+ B cells specific for mycobacterial heat-shock protein 60 or human type II collagen in synovial fluid and tissue, *Arthritis Rheum.* 40 [8], Seite 1409-1419. URL: PM:9259420
- Ruedl, C.; Bachmann, M. F. und Kopf, M. (2000): The antigen dose determines T helper subset development by regulation of CD40 ligand, *Eur.J.Immunol.* 30 [7], Seite 2056-2064. URL: PM:10940895
- Ryan-Poirier, K. A. und Kawaoka, Y. (1991): Distinct glycoprotein inhibitors of influenza A virus in different animal sera, *J.Virol.* 65 [1], Seite 389-395. URL: PM:1702161
- Salomon, B. und Bluestone, J. A. (1998): LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production, *J.Immunol.* 161 [10], Seite 5138-5142. URL: PM:9820482
- Samoilova, E. B.; Horton, J. L.; Zhang, H. und Chen, Y. (1997): CD40L blockade prevents autoimmune encephalomyelitis and hampers TH1 but not TH2 pathway of T cell differentiation, *J.Mol.Med.* 75 [8], Seite 603-608.
- Schulze-Koops, H.; Davis, L. S.; Haverty, T. P.; Wacholtz, M. C. und Lipsky, P. E. (1998): Reduction of Th1 cell activity in the peripheral circulation of patients with rheumatoid arthritis after treatment with a non-depleting humanized monoclonal antibody to CD4, *J.Rheumatol.* 25 [11], Seite 2065-2076. URL: PM:9818646
- Schulze-Koops, H. und Lipsky, P. E. (2000): Anti-CD4 monoclonal antibody therapy in human autoimmune diseases, *Curr.Dir.Autoimmun.* 2, Seite 24-49. URL: PM:11791458
- Shanafelt, M. C.; Kang, I.; Barthold, S. W. und Bockenstedt, L. K. (1998): Modulation of murine Lyme borreliosis by interruption of the B7/ CD28 T-cell costimulatory pathway, *Infect.Immun.* 66 [1], Seite 266-271.
- Sieper, J.; Kary, S.; Sörensen, H.; Alten, R.; Eggens, U.; Hüge, W.; Hiepe, F.; Kühne, A.; Listing, J.; Ulbrich, N.; Braun, J.; Zink, A. und Mitchison, N. A. (1996): Oral type II

collagen treatment in early rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial, *Arthritis Rheum.* 39 [1], Seite 41-51.

Siveke, J. T. und Hamann, A. (1998): T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines, *J.Immunol.* 160 [2], Seite 550-554.

Stone, R.; Stewart, V. C.; Hurst, R. D.; Clark, J. B. und Heales, S. J. (1999): Astrocyte nitric oxide causes neuronal mitochondrial damage, but antioxidant release limits neuronal cell death, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 893, Seite 400-403.

Sun, D.; Coleclough, C. und Whitaker, J. N. (1997): Nonactivated astrocytes downregulate T cell receptor expression and reduce antigen-specific proliferation and cytokine production of myelin basic protein (MBP)-reactive T cells, *J.Neuroimmunol.* 78 [1-2], Seite 69-78.

Sutin, J. und Shao, Y. (1992): Resting and reactive astrocytes express adrenergic receptors in the adult rat brain, *Brain Res.Bull.* 29 [3-4], Seite 277-284.

Takahashi, T.; Tagami, T.; Yamazaki, S.; Uede, T.; Shimizu, J.; Sakaguchi, N.; Mak, T. W. und Sakaguchi, S. (2000): Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, *J.Exp.Med.* 192 [2], Seite 303-310.

Tenovuo, J. (2002): Antimicrobial agents in saliva--protection for the whole body, *J.Dent.Res.* 81 [12], Seite 807-809. URL: PM:12454092

Thomma, B. P.; Cammue, B. P. und Thevissen, K. (2003): Mode of action of plant defensins suggests therapeutic potential, *Curr.Drug Targets.Infect.Disord.* 3 [1], Seite 1-8. URL: PM:12570728

Tivol, E. A.; Borriello, F.; Schweitzer, A. N.; Lynch, W. P.; Bluestone, J. A. und Sharpe, A. H. (1995): Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4, *Immunity.* 3 [5], Seite 541-547. URL: PM:7584144

Tran, E. H.; Hardin Pouzet, H.; Verge, G. und Owens, T. (1997): Astrocytes and microglia express inducible nitric oxide synthase in mice with experimental allergic encephalomyelitis, *J.Neuroimmunol.* 74 [1-2], Seite 121-129.

Trentham, D. E.; Dynesius-Trentham, R. A.; Orav, E. J.; Combitchi, D.; Lorenzo, C.; Sewell, K. L.; Hafler, D. A. und Weiner, H. L. (1993): Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis, *Science* 261 [5129], Seite 1727-1730. URL: PM:8378772

Tsuyuki, S.; Tsuyuki, J.; Einsle, K.; Kopf, M. und Coyle, A. J. (1997): Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness, *J.Exp.Med.* 185 [9], Seite 1671-1679.

Vanderlugt, C. L.; Karandikar, N. J.; Lenschow, D. J.; Dal Canto, M. C.; Bluestone, J. A. und Miller, S. D. (1997): Treatment with intact anti-B7-1 mAb during disease remission enhances epitope spreading and exacerbates relapses in R-EAE, *J.Neuroimmunol.* 79 [2], Seite 113-118.

Villoslada, P.; Hauser, S. L.; Bartke, I.; Unger, J.; Heald, N.; Rosenberg, D.; Cheung, S. W.; Mobley, W. C.; Fisher, S. und Genain, C. P. (2000): Human nerve growth factor

- protects common marmosets against autoimmune encephalomyelitis by switching the balance of T helper cell type 1 and 2 cytokines within the central nervous system, *J.Exp.Med.* 191 [10], Seite 1799-1806.
- Vyse, T. J. und Todd, J. A. (1996): Genetic analysis of autoimmune disease, *Cell* 85 [3], Seite 311-318. URL: PM:8616887
- Waterhouse, P.; Penninger, J. M.; Timms, E.; Wakeham, A.; Shahinian, A.; Lee, K. P.; Thompson, C. B.; Griesser, H. und Mak, T. W. (1995): Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4, *Science* 270 [5238], Seite 985-988. URL: PM:7481803
- Wei, R. und Jonakait, G. M. (1999): Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL- 4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia, *J.Neuroimmunol.* 95 [1-2], Seite 8-18.
- Weiner, H. L. (2001): Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells, *Microbes.Infect.* 3 [11], Seite 947-954. URL: PM:11564443
- Weise, J. B.; Meyer, J. E.; Helmer, H.; Wittrock, H. und Maune, S. (2002): A newly discovered function of palatine tonsils in immune defence: the expression of defensins, *Otolaryngol.Pol.* 56 [4], Seite 409-413. URL: PM:12378798
- Wekerle, H.; Linington, C.; Lassmann, H. und Meyermann, R. (1986): Cellular immune reactivity within the CNS, *Trends Neurosci.* 9, Seite 271-277.
- Willenborg, D. O.; Staykova, M. A. und Miyasaka, M. (1996): Short term treatment with soluble neuroantigen and anti-CD11a (LFA-1) protects rats against autoimmune encephalomyelitis: treatment abrogates autoimmune disease but not autoimmunity, *J.Immunol.* 157 [5], Seite 1973-1980.
- Willmot, M. und Bath, P. (2003): The potential of nitric oxide therapeutics in stroke, *Expert.Opin.Investig.Drugs* 12 [3], Seite 455-470. URL: PM:12605567
- Wu, C. Y.; Wang, K.; McDyer, J. F. und Seder, R. A. (1998): Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness, *J.Immunol.* 161 [6], Seite 2723-2730.
- Xiao, B. G.; Diab, A.; Zhu, J.; van der Meide, P. und Link, H. (1998): Astrocytes induce hyporesponses of myelin basic protein-reactive T and B cell function, *J.Neuroimmunol.* 89 [1-2], Seite 113-121.
- Ye, Z. C. und Sontheimer, H. (1998): Astrocytes protect neurons from neurotoxic injury by serum glutamate, *Glia* 22 [3], Seite 237-248.
- Youssef, S.; Stuve, O.; Patarroyo, J. C.; Ruiz, P. J.; Radosевич, J. L.; Hur, E. M.; Bravo, M.; Mitchell, D. J.; Sobel, R. A.; Steinman, L. und Zamvil, S. S. (2002): The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease, *Nature* 420 [6911], Seite 78-84. URL: PM:12422218
- Zeinstra, E.; Wilczak, N.; Streefland, C. und De Keyser, J. (2000): Astrocytes in chronic active multiple sclerosis plaques express MHC class II molecules, *Neuroreport* 11 [1], Seite 89-91.

Zou, J.; Rudwaleit, M.; Thiel, A.; Lauster, R.; Braun, J. und Sieper, J. (2002): T cell response to human HSP60 and yersinia 19 kDa in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis: no evidence for a causal role of these antigens in the pathogenesis, *Ann.Rheum.Dis.* 61 [5], Seite 473-474. URL: PM:11959779

9. Nicht in der Habilitationsschrift enthaltene eigene Arbeiten; im Text mit *E:* zitiert

Bechmann, I.; Lossau, S.; Steiner, B.; Mor, G.; Gimsa, U. und Nitsch, R. (2000): Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and Fas ligand (CD95L) expression but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration, *Glia* 32 [1], Seite 25-41.

Bechmann, I.; Peter, S.; Beyer, M.; Gimsa, U. und Nitsch, R. (2001): Presence of B7--2 (CD86) and lack of B7--1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo, *FASEB J.* 15 [6], Seite 1086-1088. URL: PM:11292676

Beyer, M.; Gimsa, U.; Eyüpoglu, I. Y.; Hailer, N. P. und Nitsch, R. (2000): Phagocytosis of neuronal or glial debris by microglial cells: Upregulation of MHC class II expression and multinuclear giant cell formation in vitro, *Glia* 31 [3], Seite 262-266.

Gimsa, U.; Grotzinger, I. und Gimsa, J. (1996): Two evolutionary strategies of influenza viruses to escape host non-specific inhibitors: alteration of hemagglutinin or neuraminidase specificity, *Virus Res.* 42 [1-2], Seite 127-135. URL: PM:8806180

Gimsa, U. C.; Mitchison, N. A. und Allen, R. (1997): Pharmaceutical products containing protein tyrosine kinase inhibitors and anti-CD4 antibodies, *Intern.Pat.Applic. PCT/GB97/02695*.

Mitchison, A.; Gimsa, U. und Sieper, J. (1995): Oral tolerance from a general perspective, and the possible role of side-effects in the gut, *Inflammopharmacology* 3, Seite 389-392.

Müller, B.; Gimsa, U.; Mitchison, N. A.; Radbruch, A.; Sieper, J. und Yin, Z. (1998): Modulating the Th1/Th2 balance in inflammatory arthritis, *Springer Semin.Immunopathol.* 20, Seite 181-196.

Erklärung

Die in dieser Arbeit zusammengefassten Publikationen entstanden von 1995 bis 2003. Die in den Anlagen 1-4 vorliegenden Publikationen sind Ergebnisse meiner Arbeit am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ) von 1995 bis 1997, die durch eine intensive Zusammenarbeit zwischen Prof. Dr. N. Avriou-Mitchison entstanden, wobei meine hauptsächlichen Beiträge in der experimentellen Umsetzung lagen. Ziel der Untersuchungen war zunächst die Klärung der Rolle von Collagen II in der RA. Dazu wurden von RA-Patienten Collagen II-reaktive T-Zelllinien gezüchtet und mittels verschiedener ELISAs geklärt, ob sich die Immunreaktivität von RA-Patienten durch die orale Gabe von Collagen II verändert. Da auf dem Forschungsgebiet von Toleranz und Autoimmunität die T-Helferzellphänotypen Th1 und Th2 eine wichtige Rolle spielen, und zu dieser Zeit gerade die Signalstärke am T-Zellrezeptor als Kriterium für die Th-Differenzierung gefunden wurde, wollte ich herausfinden, ob ein Eingriff in die T-Zell-Signaltransduktion durch Lck-Inhibition die Signalstärke so senken würde, dass es zu einer Th2-Differenzierung kommt. Mein nächster Schritt war dann der parallele Einsatz von anti-CD4-Antikörpern, die ja auch z.T. in Transplantationsmodellen und in RA solche Wirkung zeigten, dass eine Th2-Verschiebung anzunehmen ist. Diese Ideen habe ich in dem für *in vitro*-Versuche besonders geeigneten Ovalbumin-TCR-transgenen Mausmodell getestet und während meines Aufenthaltes am NIH, in der Gruppe von Prof. William E. Paul an einem Cytochrom C- TCR-transgenen Mausmodell überprüft.

Die in der AG Zell- und Neurobiologie des Instituts für Anatomie der Charité etablierte entorhinal-hippocampale Hirnschnittkultur fand ich äußerst interessant für neuroimmunologische Untersuchungen. Meine Idee war es, diese Hirnschnittkultur zur Untersuchung von Wechselwirkungen von ZNS-spezifischen T-Zellen mit ZNS-Gewebe einzusetzen, vor allem für Co-Kulturen mit Th1- und Th2-Zellen. Mein Ziel war es vor allem, die kontrovers diskutierte Rolle von Th2-Zellen im ZNS *in vitro* zu untersuchen, um Unwägbarkeiten, wie z.B. deren Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke mit gleicher Effizienz wie Th1-Zellen zu überwinden, auszuschalten. Meine Untersuchungen waren von dem aus DRFZ-Zeiten stammenden Gedanken getragen, dass Th1-Zellen auch im ZNS ein größeres destruktives Potential haben müssten als Th2-Zellen und dass sich „Th2-fördernde“ Bedingungen, also Bedingungen geringerer Signalstärke von APC zu T-Zelle, positiv auswirken müsste. In diese Untersuchungen ging meine Arbeitshypothese von den neuroprotektiven Eigenschaften, die ZNS-Gewebszellen besitzen könnten, ein. Befunde an Hirnschnittkulturen und Gliazellkulturen aus der Gruppe von Prof. Dr. Robert Nitsch [Hailer, 98] sowie zusätzlich die Befunden aus der Gruppe von Prof. Dr. Ingo Bechmann, wonach Astrozyten ins ZNS eindringende T-Zellen durch Fas-induzierte Apoptose töten können, stützten diese Arbeitshypothese. In diesen letzteren Untersuchungen leistete ich Beiträge zum experimentellen Design der T-Zellaktivierung und -charakterisierung.

Die Idee von Astrozyten als mögliche Gegenspieler von Mikrogliazellen entstand aus meinem Studium der Literatur von den Gruppen um Prof. Dr. Francesca Aloisi und Prof. Dr. Hans Link zu Unterschieden zwischen Mikrogliazellen und Astrozyten, und den eigenen Beobachtungen, dass Mikrogliazellen leicht zu aktivieren sind, zu leicht, um eine Entzündung im ZNS wirksam unterdrücken zu können. Die Idee, nach einer die CTLA-4-Expression modulierenden Wirkung von Astrozyten zu suchen, kam mir nach der Lektüre von Sun et al. [Sun, 97] und Xiao et al. [Xiao, 98]. Diese Autoren beschrieben eine durch Astrozytenpräsenz verminderte T-Zellproliferation und erklärten diese mit einer Herunterregulierung der TCR-Expression bzw. einer verminderten MHC-II- und ICAM-1-Expression auf APCs. Da die TCR-Expression auch bei T-Zellaktivierung herunterreguliert wird, erschien mir diese Erklärung unbefriedigend. Die Untersuchung der astrozytären NGF-Produktion entsprang ebenfalls dem Gedanken, dass Astrozyten durch ihr großes Repertoire an neurotrophen Faktoren als neuroprotektives Gegengewicht zu Mikrogliazellen in der Interaktion mit T-Zellen zu fungieren.

Ich halte die Neuroimmunologie für eine Forschungsrichtung, die in den kommenden Jahren in den Neurowissenschaften an Gewicht gewinnen wird. Die durch mich geleisteten Beiträge zum Verständnis der Wechselwirkungen von Th1- und Th2-Zellen mit hirnresidenten, potentiellen APCs, den Mikrogliazellen und Astrozyten, könnten weitreichendere Konsequenzen für die Erforschung und Behandlung entzündlicher Erkrankungen des ZNS, wie der Multiplen Sklerose, aber auch neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und das Parkinson-Syndrom haben. Die entzündliche Komponente von Morbus Alzheimer und des Parkinson-Syndroms ist bereits heute unbestritten und es gibt erste Hinweise auf eine T-Zellbeteiligung.

Danksagung

Wegen seines entscheidenden Anteils an meiner beruflichen Ausrichtung möchte ich diese Arbeit meinem Vater, Dr. rer. nat. habil. Hans Löwe, widmen.

Prof. Dr. N. Avrion Mitchison gab mir am DRFZ trotz meiner geringen Erfahrung die Chance, meinem großen Interesse an Immunologie nachzugehen. Die Zeit am DRFZ von 1995-1997 erwies sich als entscheidend für meinen weiteren beruflichen Lebensweg. Prof. Mitchison verstand es, meine Motivation stets neu zu wecken. Er war und ist mir ein unschätzbar guter Lehrer und Freund. Seiner Unterstützung habe ich auch einen Forschungsaufenthalt am NIH in der Gruppe von Prof. William E. Paul zu verdanken. Diese Zeit war für mich hochinteressant und durch die freundliche Aufnahme seitens der Kollegen dort, vor allem Dr. John Ryan und Jane Hu-Li, auch menschlich sehr angenehm. Danken möchte ich vor allem auch Priv.-Doz. Dr. Thomas Kamradt vom DRFZ und seinen ehemaligen Doktorandinnen Carmen Infante-Duarte und Melanie Estrella, die mir die Geheimnisse der T-Zellkulturen im „dwarf lab“ enthüllten. Aber auch die anderen Kollegen im DRFZ wie z.B. Priv.-Doz. Brigitte Müller trugen zu dem wissenschaftlich anregenden, hilfsbereiten, offenen und familiären Klima bei, was ich sehr schätzte und seitdem so nicht wieder erlebt habe. Diese offene Arbeitsatmosphäre wurde auch vom neuen Direktor des DRFZ, Prof. Dr. Andreas Radbruch aufrecht erhalten und gefördert und auch jetzt verbinden mich noch wissenschaftlich fruchtbare und freundschaftliche Kooperationen mit seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern. Hier seien vor allem Dr. Monika Brunner-Weinzierl und Dr. Uta Syrbe genannt. Zu Dank verpflichtet bin ich auch den Rheumatologen Prof. Dr. Joachim Sieper und Dr. Jürgen Braun vom Universitätsklinikum Benjamin Franklin für die Unterstützung meiner Untersuchungen durch Bereitstellung von Patientenmaterial.

Meinen ehemaligen Kollegen der AG Zell- und Neurobiologie, wo ich von Januar 1998 bis Juli 2001 tätig war, vor allem Prof. Dr. Robert Nitsch und Prof. Dr. Ingo Bechmann möchte ich für eine fruchtbare und konstruktive Zusammenarbeit danken, die es mir ermöglichte, das Gebiet der Neuroimmunologie zu meinem Hauptbetätigungsfeld zu machen. Prof. Nitsch förderte mich in der Anatomischen Gesellschaft und unterstützte mich dabei, einen eigenständigen Weg zu gehen, wobei mir von 2000 bis 2001 ein Rahel-Hirsch- Habilitationsstipendium eine zusätzliche Hilfe war. Für ihre technische Unterstützung bin ich Dorit Haas, von der ich viele praktische Kniffe lernen konnte, Anke Wilfinger und Gisela Duwe sehr verbunden. Mit den Doktoranden Martin Beyer, Susanne Wolf und Anita Øren, deren Betreuung mir zum Teil oder vollständig oblag, verband mich eine konstruktive Zusammenarbeit, die mit Anita Øren noch immer freundschaftlich besteht und trotz der heute bestehenden Entfernung fortgesetzt wird. An dieser Stelle möchte ich vor allem Anitas Engagement, Selbständigkeit und qualitativ hochwertige sowie sorgfältige Arbeit hervorheben.

Der Charité Berlin, allen voran Prof. Frömmel und Frau Prof. Kaczmarczyk, bin ich sehr dankbar für die Möglichkeiten, die mir das Rahel-Hirsch-Habilitationsstipendium eröffnet hat, das ich von Januar 2000 und sogar nach meinem Wechsel an die Universität Rostock im August 2001 noch bis Dezember 2001 in Anspruch nehmen konnte.

Unbedingt in diese Danksagung einschließen möchte ich die Mitarbeiter der von mir seit Januar 2002 in Rostock geleiteten Nachwuchsgruppe „Neurodegenerative Erkrankungen“ sowie die Kollegen des Neurobiologischen Labors der Klinik für Neurologie in Rostock. Dem Leiter des Neurobiologischen Labors, Prof. Dr. Arndt Rolfs sei dabei vor allem für seine freundliche Aufnahme und großzügige Unterstützung beim Aufbau der Nachwuchsgruppe gedankt. Besonders hervorheben möchte ich Dr. Eilhard Mix, mit dem ich diese Arbeit diskutieren konnte, und meine technische Assistentin Daniela Teichmann, die mit ihrer ausgezeichneten und engagierten Arbeit viel zum Gelingen meines derzeitigen neuroimmunologischen Forschungsprojektes zur Astrozyten-induzierten CTLA-4-Expression auf Th-Zellen beiträgt.

Meiner Familie, vor allem meinen Eltern und meinem Mann Priv.-Doz. Dr. Jan Gimsa, gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung und Ermutigung, meinem Mann darüber hinaus für die wissenschaftliche Zusammenarbeit, die uns trotz weit divergierender Forschungsgebiete verbindet und seine Hilfe bei der Korrektur von Manuskripten, wie auch dem vorliegenden.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln der Gemeinnützigen Hertie-Stiftung, welche mir die technischen Mitarbeiterinnen-Stellen von Anke Wilfinger und Daniela Teichmann finanzierte und finanziert, der DFG, der Universitären Forschungsförderung der Charite und des BMBF gefördert.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle; antigen-presenting cell
B7-1	CD80
B7-2	CD86
CD	Differenzierungscluster; cluster of differentiation
CD80	B7-1
CD86	B7-2
CD95	Fas; Apo-1
CD95L	FasL; Apo-1L
CD152	CTLA-4
CTLA-4	zytotoxische T-Zellen-assoziiertes Antigen-4; cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4; CD152
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
Fig.	Figure; Abbildung in den Anlagen
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1; intercellular adhesion molecule-1
IL-4	Interleukin-4
i.p.	intraperitoneal
LFA-1	Leukozyten-Funktions-assoziiertes Antigen-1; leukocyte function-associated antigen-1
MBP	basisches Myelinprotein; myelin basic protein
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex; major histocompatibility complex
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
NGF	Nervenwachstumsfaktor; nerve growth factor
NO	Stickstoffmonoxid
PGE ₂	Prostaglandin-E ₂
PLP	Proteolipidprotein
RA	Rheumatoide Arthritis
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor; T cell receptor
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β ; transforming growth factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VCAM-1	Gefäßzelladhäsionsmolekül; vascular cell adhesion molecule-1
ZNS	Zentralnervensystem